

Störungen der kardialen Nucleinsäure-
und Proteinsynthese
bei der Adriamycin-Kardiomyopathie
Eine tierexperimentelle Studie

Walter Raum

Diss. München
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0005

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

Störungen der kardialen Nucleinsäure-
und Proteinsynthese bei der
Adriamycin-Kardiomyopathie

- Eine tierexperimentelle Studie -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der
Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Walter Raum

aus

München

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. J. Zähringer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 1984

		Seite
I. Einleitung		
1.1. Vorwort		1
1.2. Zweck und Umfang der Arbeit		2
1.3. Methodik		3
1.4. Aufbau der Arbeit		4
II. Hauptteil		
2.1. Grundlagen der Theorie		5
2.2. Anwendung der Theorie auf die Praxis		6
2.3. Ergebnisse der Untersuchung		7
2.4. Diskussion der Ergebnisse		8
2.5. Zusammenfassung		9
2.6. Literaturverzeichnis		10
2.7. Anhang		11
2.8. Bibliographie		12
2.9. Zusammenfassung		13
2.10. Literaturverzeichnis		14
2.11. Anhang		15
2.12. Bibliographie		16
2.13. Zusammenfassung		17
2.14. Literaturverzeichnis		18
2.15. Anhang		19
2.16. Bibliographie		20
2.17. Zusammenfassung		21
2.18. Literaturverzeichnis		22
2.19. Anhang		23
2.20. Bibliographie		24
2.21. Zusammenfassung		25
2.22. Literaturverzeichnis		26
2.23. Anhang		27
2.24. Bibliographie		28
2.25. Zusammenfassung		29
2.26. Literaturverzeichnis		30
2.27. Anhang		31
2.28. Bibliographie		32
2.29. Zusammenfassung		33
2.30. Literaturverzeichnis		34
2.31. Anhang		35
2.32. Bibliographie		36
2.33. Zusammenfassung		37
2.34. Literaturverzeichnis		38
2.35. Anhang		39
2.36. Bibliographie		40
2.37. Zusammenfassung		41
2.38. Literaturverzeichnis		42
2.39. Anhang		43
2.40. Bibliographie		44
2.41. Zusammenfassung		45
2.42. Literaturverzeichnis		46
2.43. Anhang		47
2.44. Bibliographie		48
2.45. Zusammenfassung		49
2.46. Literaturverzeichnis		50
2.47. Anhang		51
2.48. Bibliographie		52
2.49. Zusammenfassung		53
2.50. Literaturverzeichnis		54
2.51. Anhang		55
2.52. Bibliographie		56
2.53. Zusammenfassung		57
2.54. Literaturverzeichnis		58
2.55. Anhang		59
2.56. Bibliographie		60
2.57. Zusammenfassung		61
2.58. Literaturverzeichnis		62
2.59. Anhang		63
2.60. Bibliographie		64
2.61. Zusammenfassung		65
2.62. Literaturverzeichnis		66
2.63. Anhang		67
2.64. Bibliographie		68
2.65. Zusammenfassung		69
2.66. Literaturverzeichnis		70
2.67. Anhang		71
2.68. Bibliographie		72
2.69. Zusammenfassung		73
2.70. Literaturverzeichnis		74
2.71. Anhang		75
2.72. Bibliographie		76
2.73. Zusammenfassung		77
2.74. Literaturverzeichnis		78
2.75. Anhang		79
2.76. Bibliographie		80
2.77. Zusammenfassung		81
2.78. Literaturverzeichnis		82
2.79. Anhang		83
2.80. Bibliographie		84
2.81. Zusammenfassung		85
2.82. Literaturverzeichnis		86
2.83. Anhang		87
2.84. Bibliographie		88
2.85. Zusammenfassung		89
2.86. Literaturverzeichnis		90
2.87. Anhang		91
2.88. Bibliographie		92
2.89. Zusammenfassung		93
2.90. Literaturverzeichnis		94
2.91. Anhang		95
2.92. Bibliographie		96
2.93. Zusammenfassung		97
2.94. Literaturverzeichnis		98
2.95. Anhang		99
2.96. Bibliographie		100

Meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1. Entdeckung und Entwicklung von Adriamycin	1
1.2. Pharmakokinetik von Adriamycin	4
1.3. Klinische Anwendung von Adriamycin	7
1.4. Nebenwirkungen einer Adriamycin-Therapie	11
1.4.1. Allgemeine klinische Nebenwirkungen	11
1.4.2. Nebenwirkungen am Herz	13
1.4.2.1. EKG-Veränderungen	13
1.4.2.2. Kardiomyopathie	14
1.5. Pathologie der Adriamycin-Kardiomyopathie	17
1.6. Risikofaktoren für die Entwicklung der Adriamycin-Kardiomyopathie	19

1.7.	Prophylaxe und Therapie der Adriamycin-Kardiomyopathie	21
1.8.	Methoden zur Früherkennung der Adriamycin-Kardiomyopathie	23
1.9.	Befunde zur Adriamycin-Kardio- myopathie im Tierversuch	27
1.10.	Biochemische Theorien zur Patho- genese der Adriamycin-Kardiomyo- pathie	29
2.	Methoden	
2.1.	Chemikalien	33
2.1.	Versuchstiere	33
2.3.	Bestimmung des myokardialen Proteingehalts	33
2.4.	Bestimmung der myokardialen Pro- teinsyntheserate in vivo	34
2.5.	Bestimmung des myokardialen DNS- und Gesamt-RNS-Gehalts	34

2.6.	Isolierung von pH-5-Enzymen aus Herz und Leber	34
2.7.	Isolierung von Polyribosomen aus Herzmuskel	35
2.8.	Isolierung von mikrosomaler RNS aus Herzmuskel	36
2.9.	Isolierung von messenger-RNS aus Herzmuskel	36
2.10.	Sedimentationsanalyse von Poly- ribosomen, mikrosomaler RNS und mRNS auf Sucrose-Gradienten	38
2.10.1.	Polyribosomen	39
2.10.2.	Mikrosomale RNS	39
2.10.3.	mRNS	39
2.11.	Herstellung des Weizenkeimsystems	40
2.12.	Herstellung des Retikulozyten- Lysat-Systems	40
2.13.	In-vitro-Translation von Polyribosomen	40
2.14.	In-vitro-Translation von mRNS	40

2.15.	Messung des in-vitro inkorporierten ^3H -Leucins und ^{35}S -Methionins	41
2.16.	Identifizierung der in-vitro synthetisierten Proteine	42
3.	Ergebnisse	
3.1.	Einfluß von Adriamycin auf Tier- überlebensrate, Körper- und Herz- gewicht	43
3.2.	Einfluß von Adriamycin auf die myokardiale Proteinkonzentration	45
3.3.	Einfluß von Adriamycin auf die myo- kardiale Konzentration an DNS, Gesamt-RNS und mikrosomaler RNS	45
3.4.	Einfluß von Adriamycin auf die myo- kardiale Proteinsynthese in vivo	47
3.5.	Einfluß von Adriamycin auf die Akti- vität der myokardialen pH-5-Enzyme	48
3.6.	Einfluß von Adriamycin auf die myo- kardialen Polyribosomen	48
3.6.1.	Menge der Polyribosomen	48
3.6.2.	Struktur der Polyribosomen	50
3.6.3.	Funktionstüchtigkeit der Polyribosomen	50

3.7.	Einfluß von Adriamycin auf die Struktur der mikrosomalen RNS	53
3.8.	Einfluß von Adriamycin auf die myokardiale mRNS	56
3.8.1.	Gehalt an mRNS	56
3.8.2.	Struktur myokardialer mRNS	57
3.8.3.	Funktionstüchtigkeit der mRNS	59
3.9.	Einfluß von Adriamycin auf die Zusammensetzung der in-vitro synthetisierten Proteine	61
3.10.	Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse. Entwicklung eines sich daraus ergebenden Modells der biochemischen Pathogenese der Adriamycin-Kardiomyopathie	64
4.	Diskussion	68
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literatur	73

Danksagungen

Lebenslauf

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CPK	Creatinphosphokinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendinitrilo- tetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2- -Äthansulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid
KO	Körperoberfläche
LiCl	Lithiumchlorid
LVET	Linksventrikuläre Auswurfzeit (ejection time)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNS	Messenger-RNS
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PEP	Pre-ejection-period
PMS	Post-mitochondrialer Überstand
POPOP	2,2'-p-Phylen-bis(5-phenyloxazol)
Poly(A)	Polyadenylat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonucleinsäure
rRNS	Ribosomale RNS
S	Svedberg-Einheit
SA	Spezifische Aktivität

SDS	Natriumdodecylsulfat
STI	Systolic time interval
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNS	Transfer-RNS
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenanteile

1. Einleitung

1.1. Entdeckung und Entwicklung von Adriamycin

1957 wurde in den Laboratorien der Firma Farm-italia in Mailand, Italien, ein Pigment produzierender Pilz aus einer Pilzkultur aus Apulien in Süditalien isoliert (106). Der isolierte Mikroorganismus war *Streptomyces peucetius*, das von der Kultur hergestellte Antibiotikum nannte man Daunomycin, später Daunorubicin (NSC-82 151, CAS reg.No. 23541-50-6). Arcamone (3,4) klärte die chemische Struktur auf, Di Marco (79) wies 1963 die antitumoröse Wirkung dieses Stoffes nach.

Weitergehende Untersuchungen führten mit Hilfe aerober Fermentation von *Streptomyces peucetius* bzw. *caesius* zu einem Derivat (1,4-hydroxy-daunomycin), das Adriamycin (NSC-123127, CAS reg. No. 23214-92-8) genannt wurde. Im Gegensatz zu der von der WHO vorgeschlagenen Bezeichnung (Doxorubicin) wird im deutschen Sprachraum allgemein der ursprüngliche Name Adriamycin bevorzugt.

Adriamycin ist ein Anthracyclin-Antibiotikum, bestehend aus einem Anthracyclin-Ring, der an C 7 in glycosidischer Bindung mit einem Amino-zucker verbunden ist (Abb. 1).



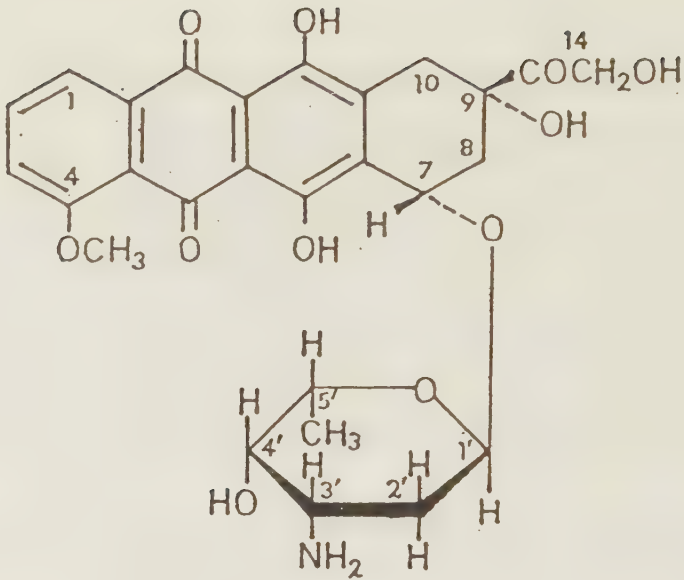


Abb. 1 Struktur von Adriamycin

Der einzige Unterschied zu Daunorubicin besteht in der Hydroxylgruppe an C 14. Eine Zusammenfassung über strukturelle Studien, physiko-chemische Eigenschaften und Methoden zur Analyse von Adriamycin bietet Arcamone (6).

Im Sommer 1968 wurde Adriamycin für den Einsatz am Menschen verfügbar. Vornehmlich unter Dr. Gianni Bonadonna am Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori in Mailand erfolgten Phase I und II der Erprobung, in deren Verlauf bis 1970 sowohl der rasche, therapeutische Effekt, das Ansprechen einer großen Anzahl von Tumoren, das Fehlen einer Kreuzresistenz mit den verfügbaren Standard-Therapeutika, als auch die allgemeinen toxischen Effekte zusammen mit der Kardiotoxizität entdeckt wurden (48,49).

In der Folgezeit wurde der Einfluß verschiedener Applikationsschemata auf den therapeutischen Effekt und die Nebenwirkungen untersucht (153,199), besonders wesentlich war das Ansprechen ansonsten nur schwer zu beeinflussender Tumorarten (69,112, 114,162).

Di Marco wies 1969 an einer Reihe experimenteller Tumoren einen höheren therapeutischen Index für Adriamycin im Vergleich zu Daunorubicin nach.

Seit Juni 1970 wurde Adriamycin in viele Kombinationsschemata der antitumorösen Therapie eingeführt und wird seither weltweit eingesetzt (51).

1.2. Pharmakokinetik von Adriamycin

Zum Verständnis sowohl seiner ausgezeichneten therapeutischen Wirksamkeit, als auch seiner gravierenden Nebenwirkungen, ist eine Kenntnis der Pharmakokinetik von Adriamycin unerlässlich.

Adriamycin kann generell nur parenteral appliziert werden und ist bei oraler Verabreichung unwirksam (7).

Nach intravenöser Applikation unterliegt das Absinken des Plasmaspiegels von Adriamycin und seinen Metaboliten einem triphasischen Verlauf: Einer kurzen Verteilungsphase mit einer Halbwertszeit von $1/2$ Std und einer Zwischenphase mit einer Halbwertszeit von etwa 8 Std folgt eine langsame Exkretionsphase mit einer Halbwertszeit von 26.7 Stunden (24,28).

Aus der kurzen Verteilungsphase kann man bereits auf ein großes Verteilungsvolumen für Adriamycin schließen. Tatsächlich kann es in vielen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen werden, in den höchsten Konzentrationen in Leber, Niere, Milz, Lunge und Herz (44). Nur im Liquor konnte es nicht nachgewiesen werden (26) und zeigt deshalb auch bei Hirntumoren keine Wirksamkeit (s.u.).

Die Aufnahme in das Zellinnere erfolgt durch einen aktiven, temperaturabhängigen Transport (151). Adriamycin findet sich nahezu ausschließlich an Kernstrukturen gebunden (59,86).

Es findet keine Rückverteilung zu anderen Zellorganellen statt (16). In einer Bindung von Adriamycin an die nucleäre DNS und einer Interkalierung zwischen einzelne DNS-Basenpaare sieht man die Ursache für den antineoplastischen Effekt von Adriamycin.

Die Ausscheidung von Adriamycin geschieht teils in originärer, teils in metabolisierter Form größtenteils über die Leber, zu einem geringeren Anteil über die Niere (15,16,24).

Die verschiedenen Schritte der Metabolisierung beschreibt Bachur (16) am Kaninchenmodell ausführlicher: Danach kommt es, zumeist intrazellulär, in vielerlei Geweben vornehmlich zur enzymatischen Ketoreduktion zu Adriamycinol (15,16). Auf mikrosomaler Ebene wird die glycosidische Bindung gespalten, O-demethyliert und mit Sulfat oder β -Glucuronsäure konjugiert (15,16). Entsprechende Endprodukte konnten auch in menschlichem Urin und Galle identifiziert werden (16, 32). Im Laufe der Phase 3 des Plasmaspiegelabfalls nimmt der Anteil der Metabolite am Gesamtspiegel laufend zu. Das beruht auf einer längeren Halbwertszeit der Metabolite (31.7 Std) gegenüber der des genuinen Adriamycins mit 16.7 Std (24). Ihr schnelles Auftreten wird auf mögliche Stoffwechselvorgänge schon im Blut zurückgeführt (24).

Die Exkretion über die Niere spielt eine untergeordnete Rolle. Innerhalb von 5 Tagen nach Applikation werden nur etwa 5-6% der gesamten verabreichten Menge Adriamycin in unveränderter oder metabolisierter Form, hier hauptsächlich Adriamycinol, ausgeschieden (24). Eine eventuell vorliegende Nierenstörung des Patienten hat keinen Einfluß auf die Toxizität (28).

Die Hauptrolle bei der Ausscheidung von Adriamycin und seinen Metaboliten spielt die Leber (40), die innerhalb einer Woche etwa 40% der applizierten Menge in unveränderter Form ausscheidet, weitere 30% metabolisiert, zumeist als Adriamycinol (28,44). Eine Ausscheidungsstörung der Leber oder der nachgeordneten Gallenwege hat einen erheblichen Einfluß auf die Toxizität von Adriamycin, was zu der Empfehlung geführt hat, bei bekannter Leberfunktionsstörung des Patienten nur eine reduzierte Adriamycin-Dosis zu verabreichen (14,23,25,26,27,28).

Einen enterohepatischen Kreislauf von Adriamycin konnte bereits Arena in seinen frühen Versuchen (7) nicht nachweisen. Adriamycin und seine Metabolite werden im Darm einer weiteren Biotransformation unterzogen, so daß Aglycone das dominierende Endprodukt im Stuhl darstellen.

1.3. Klinische Anwendung von Adriamycin

Im Laufe der Jahre hat sich Adriamycin zu einem wichtigen Zytostatikum entwickelt, da nahezu jedes Tumorgewebe in mehr oder minder ausgeprägtem Maße auf eine Therapie mit Adriamycin anspricht (93). Insbesondere zeigte sich eine gute Wirksamkeit in der Therapie ansonsten schwer therapierbarer Tumoren, z.B. des Harnblasen-Karzinoms (162), des osteogenen Sarkoms (69) und des Schilddrüsenkarzinoms (112,114).

Heute umfaßt das therapeutische Spektrum sowohl solide Tumoren als auch Leukämien bei Erwachsenen wie bei Kindern:

Allein oder in Kombination wird Adriamycin zur Therapie des Ewing-Sarkoms (67,163) und des osteogenen Sarkoms (45,69) verwandt, hier auch adjuvant (70,71,188), und auch des Weichteil-Sarkoms (115). Blum und Carter (44) geben eine Übersicht über die Remissionsraten an verschiedenen Tumorzentren (10-40%) wie auch über die Effektivität von Adriamycin (26%) im Vergleich zu anderen Therapeutika (17-52%) (vgl. auch Benjamin (31)).

Beim fortgeschrittenen Adeno-Karzinom der Mamma ist Adriamycin eines der wirkungsvollsten Zytostatika (44,45,50,67). Hohe Remissions-

raten zeigen bronchogenes Karzinom (44,45,67,183) und oat-cell-Karzinom der Lunge (45), maligne Lymphome vom Hodgkin- und Non-Hodgkin-Typ (44, 45,51,67), Leukämien (51) mit Ausnahme der akuten myeloischen Leukämie, bei der Daunorubicin erfolgreicher eingesetzt wird (43,44,202), das Schilddrüsen-Karzinom (44,51,112), Tumoren des reproduktiven Gewebes (44,45,51) und der Harnblasen-Krebs (51,67,205).

Wirksamkeit wurde nachgewiesen beim Magen-Karzinom (45), beim Adeno-Karzinom der Prostata (67), bei Multiplem Myelom (44,162), Endometrium-Karzinom (162,192), Nasopharyngeal-Karzinom (51), Liposarkom und Mesotheliom (51), sowie beim Karzinom der Cervix (44).

Von den Tumoren, die bevorzugt in kindlichem Alter auftreten, sprechen besonders gut die akute lymphatische Leukämie (44,105) und der Wilms-Tumor (51) an.

Als resistent erwiesen sich bisher das Chondrosarkom (51), das hypernephroide Nierenkarzinom (51), das maligne Melanom (51), das Colon-Karzinom (45). Gehirntumoren werden aufgrund der Blut-Hirn-Schranke von Adriamycin nicht erfaßt (24).

Neben der Einzeltherapie ist Adriamycin Teil einer Reihe wichtiger Therapie-Schemata. Zweck solcher Therapie-Schemata ist es, die Dosis der einzelnen Zytostatika relativ gering zu halten, um ihre Nebenwirkungen zu minimalisieren.

Die bisher verwendeten Schemata sind äußerst zahlreich. Sie unterscheiden sich zum einen in der Reihenfolge und Häufigkeit der Tage, an denen Adriamycin appliziert wird, als auch in der jeweiligen Einzeldosis. Beschrieben sind hauptsächlich Schemata mit wöchentlicher oder 3-wöchentlicher Verabreichung jeweils verschieden hoher intravenöser Einzelgaben mit ein- oder mehrmaliger Applikation (44,51). Eindeutige und wesentliche Unterschiede hinsichtlich ihrer therapeutischen Effizienz zeigen diese verschiedenen Applikationsarten nicht (51). Zum anderen besteht der Unterschied zwischen den Schemata in ihrer Kombination mit anderen zytostatisch wirkenden Substanzen. Eine auch nur annähernd vollständige Aufzählung aller getesteten und verwendeten Möglichkeiten überstiege den Rahmen dieser kurzen Betrachtung bei weitem. Weiterführende Darstellungen finden sich u.a. bei Benjamin (31), Blum und Carter (44) und Carter (67).

Zusammenfassend kann Adriamycin heute als eines der wichtigsten Zytostatika bezeichnet werden, das seine allgemeine Verbreitung dem überaus breiten Wirkungsspektrum und seiner hohen Wirksamkeit in der Therapie der malignen Tumoren verdankt.

1.4. Nebenwirkungen einer Adriamycin-Therapie

1.4.1. Allgemeine klinische Nebenwirkungen

Nebenwirkungen treten während einer Therapie mit Adriamycin relativ oft auf, sind aber, mit Ausnahme der später beschriebenen Kardiotoxizität, nur selten so schwer, daß man deretwegen die Therapie abbrechen müßte. Dies unterscheidet die Klasse der Anthracycline prinzipiell von anderen Zytostatika (121).

Zunächst sei kurz auf die relativ ungefährlichen Nebenwirkungen eingegangen: Wie bei einem potenten Zytostatikum zu erwarten, werden hauptsächlich schnell regenerierende Gewebe geschädigt. So treten gastrointestinale Störungen mit Übelkeit, Erbrechen und Schleimhautentzündung in 20-55%, Suppression des blutbildenden Knochenmarks mit Leuko- und Thrombopenie in 60-80%, Stomatitis in etwa 80% und Alopezie in nahezu 100% der Fälle auf (29,34,50,51,91,101,153,162,190,206). Bei ca. 10% der Patienten kann es zu einer Hyperpigmentation des Nagelbettes kommen (29,51).

Bei extravasaler Applikation verursacht Adriamycin schwere, lokale Gewebsnekrosen (44).

Die Mehrzahl der Patienten, in denen eine dieser Nebenwirkungen zum Abbruch der Therapie führt, leiden unter einer gefährlichen Myelosuppression mit Leukopenie und/oder Thrombopenie (29,206). Von der Art des Applikationschemas scheint lediglich die Stomatitis abhängig zu sein: So wurde von einem günstigeren Verlauf berichtet, wenn die Zeiträume zwischen den einzelnen Adriamycin-Gaben lang sind (50,51,67,101).

1.4.2. Nebenwirkungen am Herz

Die gravierendste Nebenwirkung einer Adriamycinbehandlung ist eine eventuell eintretende Herzmuskelschädigung. Sie führt zu einer Limitierung der Dosis und der zeitlichen Dauer der Applikation.

Aus praktischen und prognostisch bedeutsamen Gründen werden die Nebenwirkungen von Adriamycin am Herz in dosis-unabhängige, zeitlich begrenzte, reversible, relativ harmlose und meist asymptomatische EKG-Veränderungen einerseits und eine dosis-abhängige, irreversible und lebensgefährliche Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz andererseits eingeteilt (138, 206). Zwischen beiden Arten besteht kein Zusammenhang (122).

1.4.2.1. EKG-Veränderungen

Die EKG-Veränderungen treten bei etwa 11% aller behandelten Patienten auf; Literaturangaben darüber schwanken zwischen 0 und 41.2% (139). Sie äußern sich unspezifisch in Form von Sinustachykardien (169,196), supraventrikulären Tachyarrhythmien, evtl. einem A-V-Block I. Grades (196), Vorhof- und Ventrikel-Extrasystolen, Herzachsenabweichungen nach links, QRS-Erniedri-

gung, ST-Strecken-Senkung und einer Reihe anderer unspezifischer Veränderungen der S-T-Strecke und der T-Welle (138,139).

Diese Veränderungen treten völlig unabhängig von Dosierungsschema und Gesamtdosis auf, meistens wenige Stunden bis Tage nach intravenöser Gabe von Adriamycin (44). Außer einer deutlichen Abnahme der QRS-Spannungshöhe verschwinden diese Erscheinungen spontan, Arrhythmien innerhalb weniger Stunden, S-T-Segment- und T-Wellen-Abnormitäten 1 Woche bis 2 Monate nach Therapie-Ende (138, 139). Abgesehen von wenigen Patienten, die zu Beginn der Therapie bereits Herzrhythmusstörungen aufweisen, haben diese EKG-Veränderungen keine Auswirkung auf den weiteren Verlauf der Adriamycin-Therapie. Im Bedarfsfalle genügt eine symptomatische Therapie (121).

1.4.2.2. Kardiomyopathie

Die gravierendste Nebenwirkung von Adriamycin stellt die Entwicklung einer kongestiven Kardiomyopathie dar, die einen tödlichen Ausgang nehmen kann (44,92,137,154,197). Über erste diesbezügliche klinische Beobachtungen, zunächst mit Daunorubicin, berichteten Tan et al. 1967 (189), Mathé et al. 1967 (149), Malpas und Scott 1969 (144), Marmont et al. 1969 (146) und

Bonadonna u. Monfardini 1969 (47). Lefrak et al. legten 1973 (137) die erste ausführliche klinisch-pathologische Studie zur Adriamycin-Kardiomyopathie vor.

Nach diesen und allen neueren, groß angelegten, retro-und prospektiven Studien unterscheidet sich die durch Adriamycin und verwandte Anthracyclin-Antibiotika verursachte Herzinsuffizienz im klinischen Erscheinungsbild nicht von ätiologisch anders bedingten Herzinsuffizienzen (121,204). Beobachtet werden Tachykardie, Galopprrhythmus, Stauung der Halsvenen, Hepatomegalie, peripheres Ödem und Kardiomegalie (137,139,196).

Die Symptome setzen meist plötzlich ein, gelegentlich bestehen Vorboten wie nächtliche oder Belastungsdyspnoe (196).

Der Zeitpunkt des Einsetzens der Symptome ist sehr variabel und reicht von 0 bis 309 Tage nach Therapie-Ende (169), im Mittel dauert es etwa 1 Monat (196).

Nach Praga (169) kommt es bei 1.7% aller mit Adriamycin behandelten Patienten zur Adriamycin-Kardiomyopathie. Etwa 60% davon (139,196) sterben innerhalb von 1-10 Tagen (51,137,154), und zwar umso wahrscheinlicher, je früher die Symptome eingesetzt haben (51,137,154).

Die kumulative Gesamtdosis an Adriamycin ist ausschlaggebend für das Risiko, an dieser deletären Kardiomyopathie zu erkranken (121,139, 154,196). So steigt die Wahrscheinlichkeit ab einer Gesamtdosis von 550 mg/m^2 Körperoberfläche überproportional bis auf etwa 30% und mehr an (51,72,113,137,139,148,169).

Aus diesem Grund wurde frühzeitig von Gottlieb eine Dosisbegrenzung auf 550 mg/m^2 KO als wirksamste Prophylaxe der Adriamycin-Kardiomyopathie vorgeschlagen (113).

Sofortiges Absetzen des Zytostatikums und symptomatische Maßnahmen, wie Digitalis- und Diuretika-Therapie bei salzarmer Diät, vermögen den Krankheitsverlauf nicht wesentlich zu beeinflussen (122,133,137,139).

1.5. Pathologie der Adriamycin-Kardiomyopathie

Untersucht man bioptisch (32,40,147,148) oder post-mortal das Herz eines an der Adriamycin-Kardiomyopathie erkrankten oder verstorbenen Patienten, zeigen sich auffällige pathologische Erscheinungen auf makroskopischer, histologischer und elektronenoptischer Ebene:

Außerlich ist das Herz vergrößert (137), evtl. besteht ein Perikarderguß. Das Herz ist blaß und schlaff, die Ventrikel sind dilatiert und hypertrophiert, man beobachtet wandständige Thromben, während die Coronararterien und Herzklappen normal sind (72,91,137,139,144).

Lichtmikroskopisch fällt ein interstitielles Ödem, verbunden mit einer Fibrose, auf. Entzündungszeichen werden nicht beobachtet (40, 121). Beides tritt an die Stelle degenerierter und atrophierter Herzmuskelzellen (72,91,137, 144). Diese Degeneration, die zunächst fokal, später disseminiert auftritt (121), läßt sich in 2 Formen einteilen:

- (a) Der myofibrilläre Verlust verläuft unter cytoplasmatischer Vakuolisierung und
- (b) die Zellen erscheinen blaß-fleckig und zeigen neben dem Verlust ihrer Myofibrillen keine Vakuolen.

Beide Formen kommen nebeneinander vor (91). Histologisch läßt sich die Adriamycin-Kardiomyopathie gut von Strahlenschäden und auch von Koronarverschlüssen unterscheiden, nicht jedoch von Kardiomyopathien anderer Genese (121), da die Veränderungen nicht Adriamycin-spezifisch sind (173).

Elektronenoptisch zeigt sich als Korrelat dieser Veränderungen ein Verlust an kontraktile Substanz, Trennlinien in den verbliebenen Myofibrillen mit Unterbrechung der Z-Linie und Lysis (72,137,154), Schwellen der Mitochondrien mit Membranverdickungen, zerstörten Cristae und Einschlußkörperchen (59,72,137,154), Schwellen der Tubuli und Cisternen des sarkoplasmatischen Retikulums mit daraus folgender Vakuolisierung des Cytoplasmas (91) und Abnahme bzw. Verlust der Glycogen-Granula (72,137,154).

Im Zellkern kommt es teilweise zum Entspiralisieren der Chromatin-Fasern in feine Fibrillen und Filamente (59,60,195). Morphologische Veränderungen an den Nuclei bilden sich etwa 14 Stunden nach Applikation von Adriamycin zur Norm zurück (135).

1.6. Risikofaktoren für die Entwicklung der Adriamycin-Kardiomyopathie

In vielen Studien versuchte man, Risikofaktoren für die Entwicklung der Adriamycin-Kardiomyopathie zu finden.

Wichtigster Faktor ist die kumulative Gesamtdosis Adriamycin (72,137,138,154,155). Die Wahrscheinlichkeit erhöht sich mit der Dosis kontinuierlich (169), im Bereich von etwa 550 mg/m² KO steigt das Risiko überproportional auf 30% und mehr (138,154,169).

Auch das Medikationsschema scheint einen deutlichen, wenn auch nicht derart gravierenden Einfluß auf die mögliche Entstehung der Adriamycin-Kardiomyopathie zu haben. Van Hoff (196) weist nach, daß kleinere, geteilte Adriamycin-Dosen eine geringere Kardiotoxizität aufweisen als einzelne große Gaben des Medikaments. Er bevorzugt die wöchentliche Verabreichung (200). Praga (169) vermutet, daß auch eine langsame intravenöse Infusion (über 30 Minuten Dauer) weniger tödliche Kardiomyopathien verursacht als eine Bolusinjektion.

Eine deutliche Risikoerhöhung verursacht eine zusätzliche therapeutische Röntgenstrahlenexposition des Mediastinums, wie sie im Rahmen

einer kombinierten Tumor-Therapie zur Anwendung kommt. Der Effekt ist so deutlich, daß man unter diesen Bedingungen auf eine Anthracyclin-Therapie gänzlich verzichten oder zumindest die Höchstdosis auf etwa 300 mg/m² KO herabsetzen sollte (39,40,56,72,152,154,169,171).

Auch von der medikamentösen Begleit-Therapie mit Vincristin (64), Bleomycin (169), Cyclophosphamid (154,155), Actinomycin D (133), Mitomycin (62), Mithramycin (133), DTIC (187) und einer ganzen Reihe weiterer Medikamente (107), die in Kombination mit Adriamycin gegeben werden können, werden potenzierende Wirkungen hinsichtlich der Herzschiidigung berichtet.

Während hohes Alter des Patienten iibereinstimmend als Risikoerhiihung angesehen wird (55,56,196), herrscht keine Klarheit betrefis vorbestehender Herzerkrankungen (72,139,146) und erhiihten Blutdrucks.

Rasse, Geschlecht, derzeitiger Leistungsstand oder auch das zugrunde liegende Tumorleiden haben keinen signifikanten Einfluß auf die Entwicklung der Adriamycin-Kardiomyopathie (196).

Aus pharmakokinetischen Gründen (s.S. 7) wird bei Lebererkrankungen eine Reduktion der Einzel- wie auch der Gesamtdosis empfohlen (26,28).

1.7. Prophylaxe und Therapie der Adriamycin-Kardiomyopathie

Angesichts der schwierigen Situation gibt es eine Reihe von Empfehlungen, das Auftreten der Adriamycin-Kardiomyopathie zu verhindern, abzuschwächen oder die Krankheit nach ihrem Auftreten zu therapieren.

So wird vorgeschlagen, Patienten mit einem oder mehreren der oben genannten Risikofaktoren ganz von einer Anthracyclin-Therapie auszuschließen oder die applizierte Adriamycin-Dosis stark zu reduzieren.

Vorschläge zur medikamentösen Prophylaxe der Adriamycin-Kardiomyopathie (α -Tocopherol, Coenzym Q, Digitalis) gründeten sich auf tierexperimentelle Erfolge, konnten klinisch jedoch nicht bestätigt werden (17,37,73,74,99,137,161).

Weiter wurde versucht, Adriamycin-Analoga mit einem höheren therapeutischen Index zu entwickeln (32,33,66,67,119,126). Doch weder ein Adriamycin-DNS-Komplex (30,31,32,40), noch Duborimycin, Daunomycin-13-Formylhydrazon (67), Daunobenzoylhydrazon (128), Carminomycin (67), Rubidazon (32,40,129) und ein Komplex aus Adriamycin und einem Daunorubicin-DNS-Komplex (76, 193) brachten wesentliche Senkungen der Inzidenz der Kardiotoxizität.

So bleibt als einzig wirksame Prophylaxe die Dosisbeschränkung auf 550 mg/m² KO (117,122). Diese Situation ist unbefriedigend, weil möglich ist, daß ein Patient schon bei wesentlich geringeren Dosen Symptome einer Kardiomyopathie entwickelt, andere Patienten hingegen selbst bei wesentlich höheren applizierten Mengen Adriamycin keinerlei auffällige Nebenwirkungen am Herzen zeigen (108,113,196,201).

Therapiemaßnahmen entsprechend einer klassischen Herzinsuffizienztherapie sind bei der Behandlung der Adriamycin-Kardiomyopathie oft erfolglos (2,26,108,133,137,139,171,198). Methoden zur Früherkennung der Adriamycin-Kardiomyopathie erscheinen daher besonders wichtig.

1.8. Methoden zur Früherkennung der Adriamycin-Kardiomyopathie

Elektrokardiographisch zeigte sich, daß bei einer Abnahme der QRS-Spannungshöhe um mehr als 30% das Risiko für die Adriamycin-Kardiomyopathie stark ansteigt (154,155,156), dieser Hinweis aber erst auftritt, wenn auch das sofortige Absetzen des Medikaments das Auftreten der Herzinsuffizienz nicht mehr verhindert (156). Speziell ist diese Methode nicht, da ein ähnlicher Befund bei einer Reihe anderer Herzkrankheiten erhoben werden kann, so bei Perikard- und Pleuraerguß, Myokarditis, schwerer Coronararterien-erkrankung, anderen Typen von Kardiomyopathien und myoinfiltrativen Prozessen wie Metastasierung, Hämochromatose und Amyloidose (138).

Aus diesen und anderen Gründen wird das EKG als spezifische und sensitive Methode zur Früherkennung allgemein als ungeeignet angesehen (120,148, 170,174).

Auch die Untersuchung von Myokard-spezifischen Plasma-Enzymen zeigte nicht den gewünschten Erfolg (107,137,138,153). Meist treten signifikante Erhöhungen von CPK, GOT und LDH erst auf, wenn die therapierefraktäre Kardiomyopathie bereits eingetreten ist (138). Als Früherkennungsmethode erwiesen sich die Enzyme daher als ungeeignet.

Veränderungen des Systolic Time Intervalls STI (= Preejection period to left ventricular ejection time ratio PEP/LVET) wurden von mehreren Autoren beobachtet (20,51,61,103,174). Andere Autoren sehen diese Veränderungen als ungenügend für die individuelle Prognose und die mögliche Konsequenz eines Therapieabbruchs an (120,148,154).

Ohne Konsequenz blieben Versuche, die Herzgröße im Röntgenbild (103,104) oder die zeitliche Differenz zwischen QRS-Komplex im EKG und den Korotkoffschen Geräuschen in der Ellenbeuge prognostisch zu verwerten (115,116).

In neuerer Zeit erschien die Echokardiographie als vielversprechende Methode der Früherkennung einer Adriamycin-Kardiomyopathie (42,88,89,103,131,171,172). Jedoch konnte sie sich nicht als sensitiver oder spezifischer erweisen, als es für das EKG und das STI gilt (120).

Seit kurzem sind Herzleistungsparameter auch nicht-invasiv mit Hilfe der Radioisotopen-Kinangiographie zu bestimmen (132). Bei Adriamycin-behandelten Patienten zeigte sich akut in 5-100% der Fälle eine Abnahme der linksventrikulären Auswurf fraktion (185). Es gibt Hinweise für eine erhöhte Spezifität dieses Verfah-

rens gegenüber der Echokardiographie (1), doch gibt es auch bei diesem Verfahren falsch-positive und falsch-negative Befunde (124).

Die Problematik der soeben beschriebenen und anderer indirekter Untersuchungsmethoden ist die Tatsache, daß sich bereits im Bereich niedriger Dosierung bei der Mehrzahl der Patienten Veränderungen zeigen, diese aber nicht in Korrelation zum Auftreten der gefürchteten Kardiomyopathie stehen (122,141) und somit keinen hilfreichen Hinweis geben, ob eine Adriamycin-Therapie fortgesetzt werden kann oder nicht.

Wesentlich aufwendiger und für den Patienten evtl. auch gefährlicher wurde versucht, durch Gewinnung von Herzmuskelbiopsien mit anschließender histologischer Beurteilung des entnommenen Gewebes zu einer verlässlicheren Prognose hinsichtlich der Entwicklung der Adriamycin-Kardiomyopathie zu kommen (40). Dabei wird der histologische Befund in Grad 0-III eingeteilt, mit der Konsequenz des sofortigen Therapieabbruchs bei Grad III (148). Diese Methode soll den oben genannten Untersuchungsmöglichkeiten überlegen sein (147) und erlauben, einem Tumorpatienten eine über die Grenze von 550 mg/m² KO Gesamtdosis hinausgehende Menge Adriamycin mit vertretbarem Risiko bezüglich der Kardiomyopathie-Entwicklung zu geben (56,121).

Auch diese Methode hat jedoch eine Reihe von Nachteilen (91): Myokardiale Läsionen treten zunächst fokal, erst später disseminiert auf, werden also bei niedriger Dosierung nicht unbedingt erfaßt. Ein negativer Befund büßt auf diese Weise einen Großteil seiner Aussagekraft ein (121). Es ist nicht bekannt, inwieweit die meisten erhaltenen Proben vom Subendokard der rechten Seite des Septums repräsentativ für das ganze Myokard sind. Begleiterscheinungen des der Therapie zugrundeliegenden Tumorleidens wie Kachexie, Anämie, Hypoproteinämie und Infektionen vermögen ähnliche, unspezifische Erscheinungen im Myokard hervorzurufen.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß es trotz vielseitiger und intensiver Anstrengungen bis heute nicht gelungen ist, eine sensitive, spezifische, ungefährliche und praktikable Methode zur individuellen Früherkennung einer drohenden Adriamycin-Kardiomyopathie zu entwickeln (120,170).

1.9. Befunde zur Adriamycin-Kardiomyopathie im Tierversuch

Befunde im Tierversuch unterstützen die Beobachtungen am Patienten in klinischer, histopathologischer und biochemischer Hinsicht (Übersicht bei Lenaz und Page 139).

So zeigen mehrere Spezies wie Hamster und Affen (139), Huhn (162), Kaninchen, Hunde (8) und Ratten in vivo bzw. in vitro Veränderungen des EKG, der Chronotropie und Schlagunregelmäßigkeiten. Kaninchen, Affe, Ratte, Maus und Hamster entwickeln charakteristische verzögerte, dosisabhängige Veränderungen des Myokards als Antwort auf eine Adriamycin-Behandlung (35,36,65,77,129,164, 206). Dabei kommen die histologischen sowie ultrastrukturellen Veränderungen an Kaninchen und Affen denen am Menschen am nächsten (35,129,164, 166,206). Ähnliche Veränderungen wurden aber auch in Rattenherzen gesehen (107,139,206).

Das Medikationsschema hat bei Versuchstieren nur einen geringen Einfluß auf die Herzschädigung, da diese sowohl durch einmalige hohe Dosen als auch durch eine Behandlung mit niedrigen Einzeldosen (wiederholt und über längere Zeit gegeben) hervorgerufen werden kann (106).

Wie beim Menschen stellt sich ein Synergismus in der Kardiotoxizität ein, wenn man die Tiere vor einer Adriamycin-Behandlung bestrahlt (87) oder gleichzeitig Cyclophosphamid appliziert wird (77).

Therapeutisch zeigen sich im Tierversuch manchmal interessante Resultate, die jedoch bisher nicht in die menschliche Therapie eingeführt worden sind, größtenteils deswegen, weil sie zu widersprüchlich oder zu wenig belegt sind.

So soll durch eine Vorbehandlung mit Strophantin K die Aufnahme von Adriamycin in Rattenherzen in vivo und perfundierten Kaninchenherzen gehemmt werden können, verbunden mit einer Kompensation der negativen Inotropie und des verringerten Koronarflusses (8). Andere Forscher konnten diese Ergebnisse jedoch weder bestätigen (17,35,166), noch stellten sie verzögernde oder hemmende Einflüsse auf Geschwindigkeit oder Schwere der Läsionen fest (166). Für Quabain (166), DNS (136) und Prednison (117) gilt ähnliches.

1.10. Biochemische Theorien zur Pathogenese der Adriamycin-Kardiomyopathie

Ziel umfangreicher Versuche war und ist es, den molekularen Schädigungsmechanismus von Adriamycin am Herzen zu untersuchen. Im Lauf der vergangenen Jahre wurde eine Reihe bedeutender Befunde, zu- meist im Tierversuch, erhoben und auf deren Basis diverse Theorien zur Erklärung der Adriamycin-Kardiomyopathie aufgestellt.

So sollen Membranschäden der Grund für eine Stö- rung im Transportmechanismus für Kalzium sein, weshalb intrazellulär ein erhöhter Kalzium- und Natrium-Spiegel angetroffen wird, verbunden mit erhöhtem Wassergehalt des Myokards (130,164,206) und allgemeiner Elektrolytstörung (164).

In der Erhöhung des intrazellulären Kalziumspie- gels vermuten manche Autoren die Ursache für die beobachteten Nekrosen im Myokard (164). Vor al- lem aber soll vermehrtes Kalzium die mehrfach be- schriebene Hemmung der Na/K-abhängigen ATPase und einen schweren Abfall von ATP und CP verursachen (11,97,111,184,206). Einschränkend muß hier ge- sagt werden, daß eine Erhöhung der intrazellu- lären Kalzium-Konzentration unter Adriamycin- Einfluß bei Kaninchen generell praefinal beob- achtet wird, unabhängig von einer eventuell be- stehenden Kardiomyopathie (164).

Die Theorie einer Membranschädigung durch Adriamycin aufgrund seiner Fähigkeit zur Bildung von Superoxiden durch Aktivierung des Anthracyclins zum freien Radikal erhält Unterstützung durch die Beobachtung, daß eine Vorbehandlung von Mäusen mit α -Tocopherol (Vitamin E) die Lipidperoxidation und die histologischen Veränderungen bei einer Adriamycin-Behandlung verhindert (18, 160, 161). Zudem verstärkt eine Selen-freie Diät dieser Versuchstiere den Aktivitätsabfall des Enzyms Glutathion-Peroxidase und verschlimmert die Kardiomyopathie (140). Leider läßt sich dieser Befund bisher nicht beim Menschen bestätigen (121).

Die akuten und teilweise auch chronischen kardialen Nebenwirkungen einer Adriamycin-Behandlung können im Tiermodell ohne Abschwächung der antitumorösen Wirkkomponente durch Zugabe von Coenzym Q10 verhindert werden (38, 98, 99, 107, 208). Man beobachtet unter Adriamycin neben einer Aktivitätsabnahme der Succinoxidase und NADH-Oxidase (127) eine deutliche Funktionsminderung der Coenzym Q10-abhängigen Enzymsysteme für den Elektronentransfer in den Mitochondrien und im Golgi-Apparat (127). Dies wiederum könnte die Ursache für die beobachtete Funktionseinbuße der mitochondrialen Atmungskette sein (11, 65, 110, 127) und hat zu der Annahme geführt, daß die Energieversorgung der Myokardzelle über eine verminderte Funktions-

tüchtigkeit der Mitochondrien unter ein kritisches Maß sinkt und die Zelle an Energie-Mangel stirbt (102).

Von untergeordneter Bedeutung sind die Theorien, die verzögerte Adriamycin-Kardiomyopathie beruhe auf einem Autoimmunprozeß (19,95,96) oder wäre Histamin- und Katecholamin-vermittelt (57). Diese Theorien sind noch zu wenig belegt oder konnten bisher nicht reproduziert werden (100,139).

All diese Befunde und die darauf fußenden Theorien sind jedoch nicht hinreichend zur Erklärung der verzögert auftretenden Adriamycin-Kardiomyopathie (92), allenfalls genügen sie zur Erklärung einiger akuter Effekte. Keiner der soeben genannten Befunde vermag die sich manchmal sogar über Monate erstreckende Latenzzeit zwischen Applikation des Medikaments und dem Auftreten erster Symptome ausreichend zu erklären.

Aufgrund der Tatsache, daß die antitumoröse Wirkung des Adriamycins und verwandter Anthracycline auf einer Interaktion mit der DNS im Zellkern in Form einer Interkalierung zwischen die DNS-Basenpaare beruht (64,79,81,82,118,127,134,159,167,197,206) und der entsprechende Mechanismus an myokardialer DNS nachgewiesen wurde (13,59,64,80), entstand eine Theorie, die die verzögerte Adriamycin-Kardiomyopathie auf eine Störung des Nucleinsäuremetabolismus und der Proteinsynthese im Herzmuskel zurückführt (3).

Eine Reihe von Beobachtungen stützen diese Hypothese: So wird nach Interkalierung in die myokardiale DNS die Transskription und Replikation behindert (79), ersichtlich an einem verminderten Einbau von Präkursoren wie z.B. Thymidin in die DNS (9,56,100,177,178) und z.B. Adenin in die RNS (5,8,9,10,179,215). Zusätzlich kommt es zu einer Inhibierung der DNS-Reparierungsenzyme (94). Gleichzeitig wird die Proteinsynthese inhibiert (10). Da Herzmuskelproteine eine relativ kurze Halbwertszeit von 1-2 Wochen haben (208), erschien es mehreren Autoren wahrscheinlich, diese Mechanismen als die wesentliche Ursache für die verzögerte Adriamycin-Kardiomyopathie und die damit verbundene, teilweise letale Herzinsuffizienz anzusehen (91,139,177,206,208,211).

Inhalt dieser Arbeit war es, diese Hypothese näher zu untersuchen. Dazu wurden teils etablierte, teils neue Methoden verwandt, um am Tiermodell den Einfluß von Adriamycin auf den Gehalt, die Struktur und die Funktionstüchtigkeit myokardialer Nucleinsäuren festzustellen.

Mit den durchgeführten Untersuchungen sollte somit ein Beitrag zur Erkenntnis der molekularbiologischen Pathogenese der Adriamycin-Kardiomyopathie geleistet werden.

2. Methoden

2.1. Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von der Firma Sigma bezogen. Ungeröstete Weizenkeime lieferte die Firma Keimdiät in Augsburg, L-Leucin (4,5- $^3\text{H}(\text{N})$), SA 30-50-Ci/mmol und L-Methionin (^{35}S), SA 835 Ci/mmol die Firma New England Nuclear in Dreieich.

2.2. Versuchstiere

Verwandt wurden männliche Sprague-Dawley Ratten im Alter von 6 Wochen und einem Körpergewicht von 150 Gramm.

Die Applikation von Adriamycin erfolgte intraperitoneal (Konzentration: 50 mg Adriblastin^R gelöst in 25 ml NaCl), Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen 0.9% NaCl. Die Tiere wurden über Nacht gefüttert. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation.

2.3. Bestimmung des myokardialen Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts im Homogenat erfolgte nach Lowry et al (142) unter Verwendung von Rinderserum-Albumin als Standard.

2.4. Bestimmung der myokardialen Protein-syntheserate in vivo

Die Messung der Proteinsyntheserate in vivo erfolgte mit (^3H)-Leucin. Die injizierte Radioaktivität war 20-50 μCi je 100g Körpergewicht. Zweieinhalb Stunden nach Applikation wurden die Herzen entnommen und in 5 Vol 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 250 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 250 mM Sucrose, 1% Triton homogenisiert, der Proteingehalt nach Lowry (142), die inkorporierte Radioaktivität nach Mans und Novelli (145) bestimmt.

2.5. Bestimmung des myokardialen DNS- und Gesamt-RNS-Gehaltes

Die Bestimmung der DNS und Gesamt-RNS im Herzmuskel erfolgte nach Munro u. Fleck (159).

2.6. Isolierung von pH 5-Enzym aus Herz und Leber

Die Isolierung der pH 5-Enzym-Fraktion aus Herzmuskel und Leber wurde nach Baliga et al. (21,207) vorgenommen:

Jeweils etwa 5g Gewebe wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 250 mM Sucrose homogenisiert. Der PMS (12 500 Upm / 20 min / SS 34 Rotor) wurde zentrifugiert (40 000 Upm / 120 min / Ti 50 Rotor), der erhaltene post-mikrosomale Überstand durch Sephadex-G 25 passiert.

Die rötlichen Fraktionen wurden gesammelt, gepoolt und mit 1N CH_3COOH auf pH 5.2 gebracht, (20 min / 4°C). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 000 Upm / 10 min) gesammelt und in 1 ml 50 mM Hepes, pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 10 mM DTT gelöst.

2.7. Isolierung von Polyribosomen aus Herzmuskel

Polyribosomen aus Herzmuskel wurden wie folgt isoliert (vgl. Zähringer et al. (212)):

10 gepoolte Herzen wurden in 8 Vol. 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 250 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 250 mM Sucrose und 1% Triton X-100 homogenisiert. Der PMS (12 500 Upm / 20 min / SS 34 Rotor) wurde auf eine DOC-Konzentration von 1% gebracht und durch einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradient (0.5 M / 2 M Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 500 mM NH_4Cl) zentrifugiert (28 000 Upm/16-20 Std/Rotor 30). Das erhaltene, klare Polyribosomenpellet wurde in 50-100 μl Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT gelöst und bei -40°C (bis -80°C) ohne nennenswerte Aktivitätsverluste über Monate aufbewahrt. Die Konzentration der Polyribosomen wurde bestimmt durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm Wellenlänge ($\text{OD}_{260\text{nm}}$) unter Verwendung eines Konversionsfaktors von $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 66 \mu\text{g}$ Ribosomen / ml (21).

2.8. Isolierung von mikrosomaler RNS aus
Herzmuskel siehe 2.9.

2.9. Isolierung von messenger-RNS aus Herz-
muskel

Zur Gewinnung von mRNS aus Herzmuskel wurden jeweils 8-25 Rattenherzen gepoolt. Nach Homogenisation (Kombination aus Ultra-Turrax (2x10 Sek., 20 000 UpM) und Potter-Elvehjem Homogenisator (3 Hübe, 2 000 UpM)) in 8 Vol. 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 250 mM Sucrose, 1% Triton-X-100 und 100 U/ml Heparin, wurde der PMS durch Zentrifugation erhalten (12 500 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, 4°C), anschließend zur Gewinnung der Mikrosomen durch ein Sucrosekissen (2 ml 1.4 M Sucrose in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 500 mM NH₄Cl) zentrifugiert (50 000 UpM, 2 Std., Ti 60 Rotor, 4°C). Alternativ kann der PMS auch direkt zentrifugiert werden (42 000 UpM, 70 Min., Ti 60 Rotor, 4°C). Die pelletierten Mikrosomen wurden in 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 U/ml Heparin, 0.1% SDS (ca. 3-faches Volumen des Gewichts der eingesetzten Herzen) suspendiert, dann unter Rühren auf eine SDS-Konzentration von 1% gebracht.

Zur Phenolextraktion der mikrosomalen RNS wurde unter Zugabe von 1 Vol. pH 8.3-puffergesättigter Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol-Lösung (50/50/1, v/v/v) 15 Min. bei Raumtemperatur gerührt

und die RNS-haltige wässrige Phase von der Phenolphase durch Zentrifugation (10 000 UpM, 15 Min., SS 34 Rotor, 20°C) getrennt. Die wässrige Phase wurde noch zweimal durch Zugabe von 1/2 - 1 Vol. puffergesättigter Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol-Lösung extrahiert. Durch Zugabe von 2 Vol. Äthanol ließ man die mikrosomale RNS in Gegenwart von 2% Kalium-Azetat (pH 5.5) über Nacht bei -20°C präzipitieren.

Nach dem Fällern wurde die mikrosomale RNS pelletiert (13 000 UpM, 20 Min., SS 34 Rotor, -20°C) und 2x mit 0.2 M NaCl/Äthanol (1:2, v/v, -20°C) gewaschen. Die letzte pelletierte mikrosomale RNS wurde in 10-20 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl aufgelöst (10-15 OD_{260nm}/ml). Nach kurzem Erhitzen (3-5 Min., 58°C) zur Auflösung von RNS-Aggregaten und rascher Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die in der Gesamt-RNS enthaltene, Poly(A)-reiche mRNS durch Affinitäts-Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose erhalten (12,90,109). Dazu wurde eine Oligo(dT)-Säule mit 0.5 g Oligo(dT)-Cellulose erstellt, die mit Hochsalzpuffer (20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl) gewaschen wurde. Die mikrosomale RNS wurde auf die Säule aufgetragen, und bei einer langsamen Flußrate von ca. 10 ml/Std. wurde die nicht absorbierte non-Poly(A)-RNS gesammelt. Die Oligo(dT)-Säule wurde sequentiell mit 30 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl und 30 ml 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.15 M KCl gewaschen. Die absorbierte Poly(A)-enthaltende mRNS wurde mit 2.5 ml 1 mM Hepes, pH 7.0 eluiert, indem die K⁺-Konzentration auf Null erniedrigt wurde.

Die Konzentration einer Lösung von Gesamt-RNS oder mRNS wurde durch Messung ihrer optischen Dichte bei 260 nm in einem Gilford-Spectrophotometer bestimmt ($OD_{260nm}(1\%) = 250$). Die mRNS kann ohne Aktivitätsverlust über Monate / Jahre bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt werden. Nach jedem Teilschritt wurden Aliquots von 250-500 μl abgenommen und aufbewahrt.

In einigen Versuchen wurde die gewonnene mRNS ein zweites Mal auf die Oligo(dT)-Cellulose-Säule appliziert. Hierzu wurde sie mit 2 Vol. Äthanol bei $-20^{\circ}C$ präzipitiert, anschließend in 20 μl 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, aufgenommen. Anschließend wurden 180 μl DMSO und 20 μl gepufferte 1.0 M LiCl-Lösung hinzugegeben, für 3 min auf $55^{\circ}C$ erhitzt, 20-fach mit 20 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 M KCl verdünnt. Die Oligo(dT)-Cellulose-Passage wurde wiederum durchgeführt wie oben beschrieben.

2.10. Sedimentationsanalyse von Polyribosomen, mikrosomaler RNS und mRNS auf Sucrose-Gradienten

Die Struktur der erhaltenen Polyribosomen, der mikrosomalen RNS und der mRNS wurde durch Sedimentationsanalyse auf Sucrosegradienten untersucht:

2.10.1. Polyribosomen

Etwa 100-200 µg Polyribosomen wurden auf einen linearen Sucrose-Gradienten (10-40% Sucrose, gelöst in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$) aufgetragen und bei 42 000 UpM für 70 min bei 4°C in einem SW 50.1 Rotor in einer Beckmann 1-65 Zentrifuge zentrifugiert. Das Sedimentationsverhalten wurde durch eine Fließzelle in einem Gilford-Spectrometer bei 260 nm gemessen.

2.10.2. Mikrosomale RNS

Mikrosomale RNS wurde in einer Menge von 50-100 µg auf einen linearen Sucrose-Gradienten (5-40% Sucrose, gelöst in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 25 mM EDTA) aufgetragen und mit 45 000 UpM für 5 Std bei 4°C in einem SW 50.1 Rotor zentrifugiert.

2.10.3. mRNS

Messenger-RNS wurde in einer Menge von 25-50 µg in gleicher Weise wie die mikrosomale RNS analysiert. Einige Male wurde der Sucrose-Gradient in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS gelöst, was weniger RNS-Aggregate am Grund des Gradienten zu ergeben schien.

2.11. Herstellung des Weizenkeim-Systems

Das Weizenkeimsystem (S30) wurde als 30 000g Oberstandsfraktion präpariert, wie von Roberts und Paterson (175) angegeben. Allerdings wurde auf eine Präinkubation vor der Trennung auf der Sephadex-G25-Säule verzichtet (212).

2.12. Herstellung des Retikulozyten-Lysat-Systems

Die Herstellung des mRNS-abhängigen Retikulozytenlysatsystems entsprach vollständig den Angaben von Pelham und Jackson (165). Es wurde hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Herrn Dr. R. Kandolf.

2.13. In-vitro-Translation von Polyribosomen

Die Assays zur zellfreien Translation der Polyribosomen aus Herz enthielten in 25 µl Reaktionsassay 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 80 mM NH₄Cl, 2 mM ATP, 0.2 mM GTP, 2 mM DTT, 2 µl radioaktives Leucin (SA 30-50 Ci/mmol) und 5 µl pH-5-Enzyme. Die Reaktion erfolgte für 60 min bei 37°C (212).

2.14. In-vitro-Translation von mRNS

Zur Translation der mRNS im Weizenkeimsystem enthielten die 25 µl-Assays 28 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 100 mM K-Acetat, 2.4 mM Mg-Acetat,

0.8 mM ATP, 0.2 mM GTP, 2 mM DTT, 8 mM Kreatinphosphat, 10 µg/ml Kreatinphosphokinase, 20-30 µM Aminosäuremischung ohne Leucin bzw. Methionin, 3.2 µM ^3H -Leucin oder 3.2 µM ^{35}S -Methionin, 50 µM Spermin, 200 µM Spermidin, 5 µl Weizenkeimsystem S-30 und 0.5-1.0 µg mRNS. Die Reaktion erfolgte bei 25°C über 120 min.

Die Translation der mRNS im Retikulozytenlysat entsprach der Methode von Pelham und Jackson (1965).

2.15. Messung des in-vitro inkorporierten ^3H -Leucins und ^{35}S -Methionins

Die Inkorporation von ^3H -Leucin und ^{35}S -Methionin in vitro und in vivo in das synthetisierte Gesamtprotein wurde sowohl bei Translation der Polyribosomen als auch der mRNS nach einer Modifikation der Methode von Mans und Novelli (1965) bestimmt:

5 µl des Reaktionsgemisches wurden sofort nach Ablauf der Inkubationszeit auf Whatmann 3 MM Papierscheibchen von 24 mm Durchmesser aufgetragen, getrocknet und anschließend gewaschen in 10% TES, 10 min, 4°C; 5% TES, 5 min, 4°C; 5% TES, 10 min, 90°C; 5% TES, 5 min, 4°C; Äther / Äthanol 1:1 v/v, 1 min, Raumtemperatur, zweimal; Äther, 1 min, Raumtemperatur; wiederum getrocknet unter einer Infrarotlampe für 15 min

und die Radioaktivität anschließend in einem Packard BF 5000 Liquid-Scintillationszähler in 10 ml Toluol/PPO/POPOP bei einer Zähleffizienz von 36% für ^3H -Leucin gemessen.

2.16. Identifikation der in vitro synthetisierten Proteine

Nach der zellfreien Inkubation wurden 1-5 μl Aliquote zur Bestimmung der Radioaktivitätsinkorporation in Gesamtprotein verwandt, wie in Kap. 2.15. beschrieben. Zu einem anderen Aliquot von 1 μl wurden 25 μl 62 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-merkaptoäthanol gegeben. Nach Erhitzen (100°C, 5 min) wurde die Probe auf SDS-Polyacrylamid-Gelen analysiert gemäß (212). Dabei wurden 10-15% Gradienten-Slabgele oder 10% diskontinuierliche Gele verwandt (143). Um Standard-Protein-Banden zu zeigen, wurden die Gele gefärbt (1 Std mit 0.2% Coomassie-Brillant-Blue in 50% Methanol, 7% Eisessig (v/v)) und entfärbt (über Nacht in 5% Methanol, 7% Eisessig (v/v)), anschließend für die Fluorographie gemäß Bonner und Laskey (52) vorbereitet. Der Film (Kodak X-Omat R Film (XR-5)) wurde bei -80°C für 1-7 Tage der Bestrahlung ausgesetzt, abhängig von der Menge an Radioaktivität, die in der Inkubationsprobe vorhanden war (212).

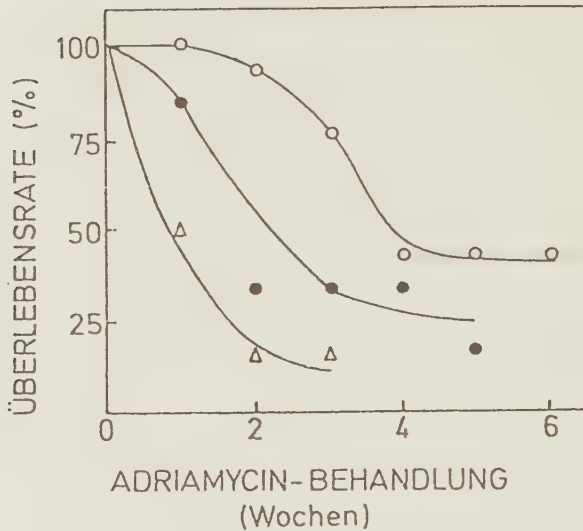
3. Ergebnisse

3.1. Einfluß von Adriamycin auf Tierüberlebensrate, Körper- und Herzgewicht

In den Untersuchungen wurden zunächst zwei verschiedene Dosierungsschemata für Adriamycin verwandt. Lenaz und Page (139) beschrieben die zyklische Applikationsweise: Tag 1-3 je 1 mg/kg KG Adriamycin i.p., Tag 4-7 Pause; Wiederholung bis zu dreimal. Formelli et al. (100) empfahlen eine einmalige i.p. Applikation der Gesamtdosis: 10-15(-20) mg/kg KG und eine Zeitdauer von 1-4 Wochen bis zum Versuch. Ein Vergleich beider Methoden im Rahmen der eigenen Untersuchungen erbrachte identische Resultate. Die Versuchstiere erhielten daraufhin die erforderliche Adriamycin-Dosis überwiegend als einmalige, intraperitoneale Applikation.

Abb. 2 verdeutlicht die Abhängigkeit der Mortalitätsrate von der Adriamycin-Dosis. Tiere, die 15 mg/kg KG erhalten hatten, hatten eine Mortalitätsrate von ca. 75% in den ersten beiden Wochen, bei 10 mg/kg KG betrug die Mortalitätsrate ca. 50%. Bei Injektion von 20 mg/kg KG starben nahezu alle Versuchstiere innerhalb der ersten beiden Wochen. Bei zyklischer Gabe von Adriamycin (1 mg/kg KG x 3 Tage pro Woche) lag die Überlebensrate deutlich höher: Ca. 90% nach 2 Wochen, 50% nach 4 Wochen.

Ähnliche Befunde wurden von Formelli et al. (100) und Philips et al. (166) mitgeteilt.



- 1mg/kg KG (N=16)
- 10mg/kg KG (N=54)
- △ 15mg/kg KG (N=48)

Abb. 2: Überlebensrate von Ratten nach Gabe von Adriamycin

Dosierung: 1 mg/kg KG Adriamycin 3x/Woche i.p.;
10 bzw 15 mg/kg KG als einmalige Dosis i.p.;
N = Zahl an Tieren zu Beginn des Versuchs

Tabelle 1 zeigt den Einfluß von Adriamycin auf das Körpergewicht und Herzgewicht: Die bei den Tieren zu erwartende Körpergewichtszunahme (s. Kontrolltiere) bleibt bei den zytostatisch behandelten Tieren aus. Das Herzgewicht nahm im Versuchszeitraum in Abhängigkeit von der vorher applizierten Dosis Adriamycin deutlich ab (Tab. 1).

3.2. Einfluß von Adriamycin auf die myokardiale Proteinkonzentration

Während sich das Herzgewicht bei den Adriamycin-behandelten Tieren deutlich vermindert hatte, änderte sich die myokardiale Proteinkonzentration nur unwesentlich (Tab. 1).

3.3. Einfluß von Adriamycin auf die myokardiale Konzentration an DNS, Gesamt-RNS und mikrosomaler RNS

Der myokardiale Gehalt an DNS, Gesamt-RNS und mikrosomaler RNS nahm gering (DNS) bis deutlich (RNS) ab (Tab. 1). Ursache dieser Veränderungen könnte eine Interaktion zwischen Adriamycin und der nukleären DNS sein. Aufgrund der gestörten Transskriptionsvorgänge kommt es über eine verminderte RNS-Synthese zu den beobachteten erniedrigten RNS-Spiegeln.

Tabelle 1: Überlebensrate, Körper- und Herzgewicht.
Myokardialer Gehalt an DNS, RNS und Protein

Parameter	Kontroll- gruppe	Adriamycin-Gruppe	
		10 mg/kg KG	15 mg/kg KG
Überlebensrate	100%	57%	22%
Körpergewicht (g)			
- Ausgangsgew.	133 $\pm$ 15.3 (11)	134 $\pm$ 17.1 (11)	133 $\pm$ 16.5 (11)
- Endgew.	176 $\pm$ 23.4 (11)	137 $\pm$ 23.6 (11)	130 $\pm$ 36.2 (11)
Herzgewicht (g)	0.55 $\pm$ 0.06 (11)	0.42 $\pm$ 0.05 (11)	0.40 $\pm$ 0.09 (11)
DNS-Gehalt (mg/g Herz)	1.43 $\pm$ 0.12 (6)	1.31 $\pm$ 0.13 (6)	1.28 $\pm$ 0.16 (5)
RNS-Gehalt			
- Gesamt-RNS (mg/g Herz)	2.05 $\pm$ 0.18 (6)	1.71 $\pm$ 0.17 (6)	1.65 $\pm$ 0.23 (5)
- Mikrosom. RNS (μ g/g Herz)	703 $\pm$ 70 (11)	625 $\pm$ 113 (11)	616 $\pm$ 108 (11)
Protein-Gehalt (mg/g Herz)	171 $\pm$ 27 (6)	166 $\pm$ 20 (6)	164 $\pm$ 19 (5)

Jede Aufarbeitung enthielt 5-10 Ratten (Werte: $\bar{x} \pm$ SD, Anzahl der Aufarbeitungen). Die Überlebensrate bezieht sich auf diejenige Anzahl an Tieren, die 14 Tage nach Adriamycin-Injektion noch am Leben waren (Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs: 54 Tiere).

Eine gesteigerte Abbaugeschwindigkeit myokardialer RNS durch erhöhte Ribonuclease-Aktivität kommt theoretisch ebenfalls als Erklärungsmöglichkeit in Frage, wurde durch eigene Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation aber ausgeschlossen (vgl. Kap. 3.6.-3.8.).

3.4. Einfluß von Adriamycin auf die myokardiale Proteinsynthese in vivo

Arena et al. (9) hat 1974 an Adriamycin-behandelten Mäusen (10 mg/kg KG) eine deutlich reduzierte Aminosäure-Inkorporation in Herzmuskelprotein beschrieben.

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich bei einer Adriamycin-Dosis von 10 mg/kg KG keine signifikante Änderung der ^3H -Leucin-Einbaurrate, hingegen bei 15 mg/kg KG eine Abnahme um 30%.

Diese Ergebnisse sind nur bedingt aussagekräftig, da, wie auch bei Arena (9), keine Untersuchungen bezüglich eventueller Änderungen der Präkursoren- und Intermediär-Pools durchgeführt wurden. Änderungen dieser Pools hätten jedoch unmittelbare Auswirkungen auf die erhaltenen Daten. Grundsätzlich könnten sowohl Änderungen im Aminosäuren-Pool (vgl. bei (168) für gehungerte Tiere) wie auch im tRNS-Pool eingetreten sein (vgl. Kap. 3.3).

3.5. Einfluß von Adriamycin auf die Aktivität der myokardialen pH-5-Enzyme

Abb. 3 zeigt den Einfluß von Adriamycin auf die Aktivität der myokardialen pH 5 Enzyme. Die Tiere hatten als einmalige Dosis 10 mg/kg KG Adriamycin i.p. 2 Wochen vor dem Versuch erhalten. Die Aktivität der myokardialen pH 5 Enzyme hatte hierbei um 31% abgenommen. Ähnliche Resultate erbrachten Versuche mit einer Adriamycin-Dosis von 15 mg/kg KG.

3.6. Einfluß von Adriamycin auf die myokardialen Polyribosomen

Adriamycin könnte die myokardialen Polyribosomen auf verschiedene Weise beeinflussen:

- (a) Eine quantitative Verringerung der Polyribosomen aufgrund verminderter Synthese und/oder gestörter Anlagerungsfähigkeit der Vorstufen mRNA und/oder rRNA an die ribosomalen Untereinheiten.

- (b) Ein gesteigerter Abbau der myokardialen Polyribosomen.

- (c) Eine Strukturveränderung der Polyribosomen.

- (d) Eine Einwirkung von Adriamycin auf die Funktionstüchtigkeit der Polyribosomen.

3.6.1. Menge der Polyribosomen

Um eine eventuelle Wirkung von Adriamycin auf den myokardialen Gehalt an Polyribosomen festzustellen, wurden diese wie oben beschrieben (2.7.) aus Kontrolltieren und Tieren extrahiert,

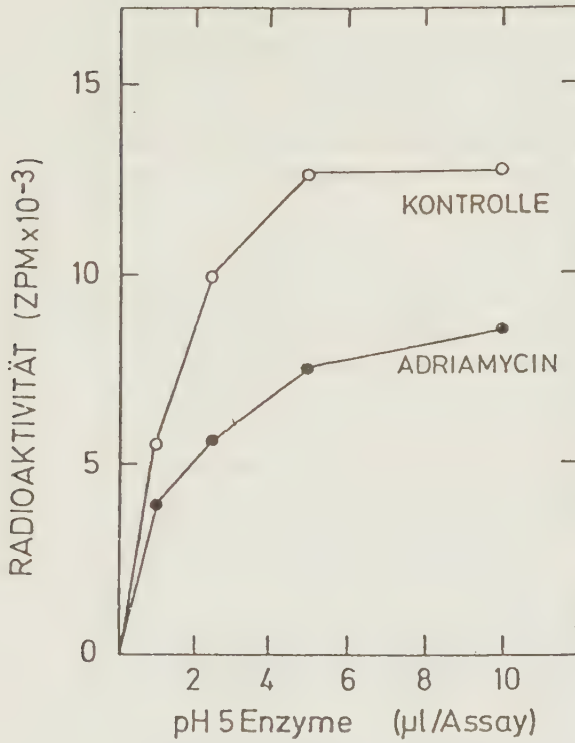


Abb. 3: Einfluß von Adriamycin auf die Aktivität der myokardialen pH 5 Enzyme

○—○ Normale Tiere
●—● Behandelte Tiere

denen über eine Zeit von 1-3 Wochen Adriamycin zyklisch (139) appliziert worden war. Es zeigte sich eine erhebliche Abnahme des Polyribosomenspiegels um 30-39%, ausgehend von einem Normalwert von 865 $\mu\text{g/g}$ Herz (Abb. 4). Bei einer einmaligen Gabe von Adriamycin (10-15 mg/kg KG) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

3.6.2. Struktur der Polyribosomen

Strukturunterschiede der Polyribosomen aus Adriamycin-behandelten und unbehandelten Tieren würden sich in einem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten auf Sucrosegradienten zeigen.

Abb. 5 zeigt, daß keine wesentlichen Abweichungen im Kurvenverlauf bei den beiden Versuchstiergruppen beobachtet wurden. Die noch vorhandenen myokardialen Polyribosomen sind somit strukturell intakt geblieben.

Dieses Ergebnis schließt eine erhöhte Abbaurate myokardialer Polyribosomen aufgrund einer gesteigerten Ribonuclease-Aktivität aus.

3.6.3. Funktionstüchtigkeit myokardialer Polyribosomen

Die funktionelle Integrität der myokardialen Polyribosomen wurde durch Bestimmung ihrer

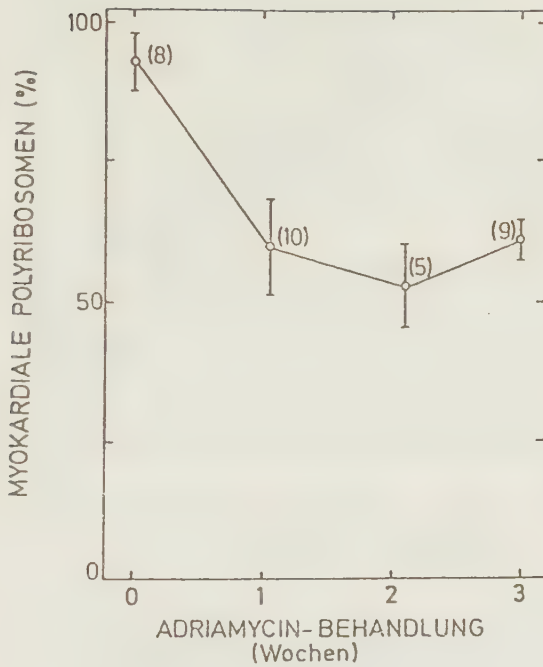
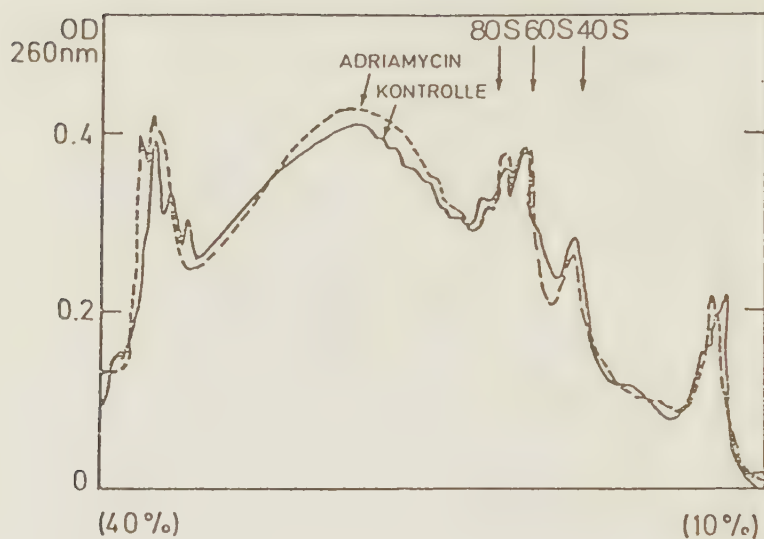


Abb. 4: Einfluß von Adriamycin auf den myokardialen Gehalt an Polyribosomen.

Adriamycin-Applikation: 1 mg/kg KG, i.p.
3 Tage/Woche bis zur Dekapitation;
Werte = Mittelwerte $\pm$ SD (Anzahl der
Aufarbeitungen)



SUCROSE-GRADIENT

Abb. 5: Sedimentationsanalyse myokardialer Polyribosomen unter Adriamycin-Einfluß.

---- Adriamycin-behandelte Tiere
(1 mg/kg KG, 3x/Woche, 3 Wochen)

— Kontrolltiere

Ein ähnliches Bild ergab sich bei anderen Applikationsschemata (10-15 mg/kg KG einmalige Dosis).

in-vitro-Proteinsynthese-Kapazität in Gegenwart von pH 5 Enzymen untersucht.

Abb. 6 zeigt, daß kein signifikanter Unterschied in der Translationsfähigkeit der Polyribosomen aus Adriamycin-behandelten und Kontrolltieren besteht. Damit ist nachgewiesen, daß die funktionelle Integrität der myokardialen Polyribosomen durch Adriamycin nicht beeinflußt wurde.

Eine quantitative Verminderung der Polyribosomen bei gleichzeitiger struktureller und funktioneller Integrität kann auf einer Verminderung der erforderlichen Vorstufen der Polyribosomen beruhen: Das sind einerseits die Ribosomen, andererseits die mRNA.

3.7. Einfluß von Adriamycin auf die Struktur der mikrosomalen RNS

Das Sedimentationsverhalten der mikrosomalen RNS als Hauptbestandteil der Ribosomen wurde auf Sucrosegradienten untersucht.

Der identische Kurvenverlauf in Abb. 7 zeigt, daß Adriamycin in den untersuchten Dosierungen keinerlei Einfluß auf die mikrosomale RNS hatte, die ja überwiegend aus ribosomaler RNS besteht (s. Abb. 7 mit 18S und 28S Peak der ribosomalen RNS).

Ebenso gibt es keine Anzeichen erhöhter Ribonucleaseaktivität in Form pathologischer Abbauprodukte mit niederen Sedimentationskoeff-

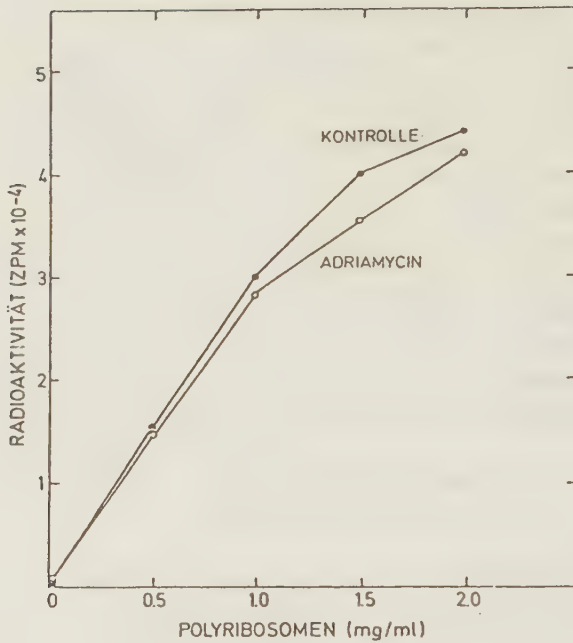


Abb. 6: Translationsfähigkeit myokardialer Polyribosomen aus normalen (●—●) und Adriamycin-behandelten (○—○) Tieren.
Applikation: 10 mg/kg KG Adriamycin i.p.;
Tötung der Tiere nach 14 Tagen.

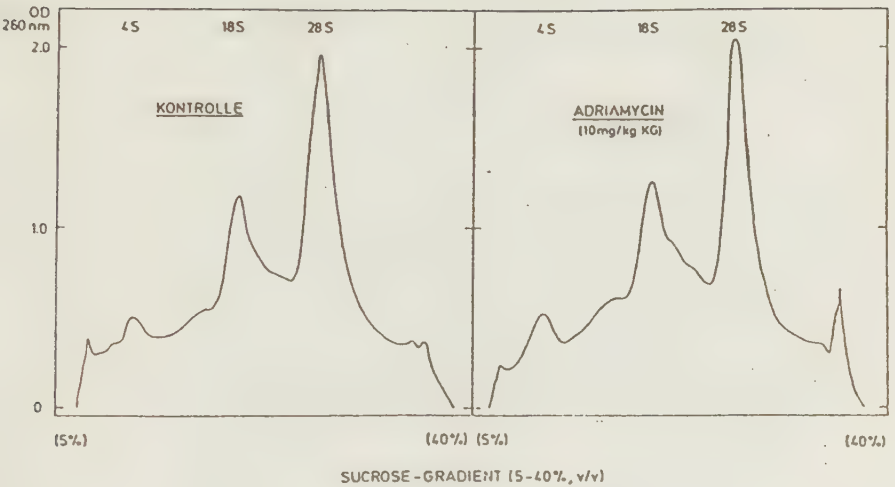


Abb. 7: Sedimentationsverhalten der mikrosomalen RNS auf kontinuierlichen Sucrosegradienten.
Die Tötung der Tiere erfolgte 2 Wochen nach Adriamycin-Applikation.
Auf den Gradienten wurden je 100µg RNS aufgetragen.

fizienten. Adriamycin senkt zwar den Spiegel an mikrosomaler RNS (Tab. 1), übt aber keinen Einfluß auf Struktur und Verteilungsmuster der Polyribosomen (Abb. 5) und der ribosomalen RNS (Abb. 7) aus.

3.8. . Einfluß von Adriamycin auf die myokardiale mRNS

Die Beurteilung der Auswirkungen einer Adriamycin-Behandlung auf die myokardiale mRNS als Vorstufe der Polyribosomen erfordert Untersuchungen des Gehalts, der Struktur und der Funktionstüchtigkeit der mRNS. Eine Beeinflussung auch nur eines dieser Parameter hätte Auswirkungen auf die Proteinsynthese im Herzmuskel.

3.8.1. Gehalt an mRNS

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Integrität der myokardialen Polyribosomen nach Adriamycin-Behandlung läßt die drastische Abnahme des myokardialen Polyribosomen-Gehalts (3.6.1.) am ehesten eine Abnahme der Vorstufe, der mRNS, erwarten.

Zum Nachweis dieser Hypothese wurde mRNS nach dem in Kap. 2.9. beschriebenen Verfahren quantitativ extrahiert. Den Versuchstieren wurde 2 Wochen vor Dekapitation je eine Dosis von 10 bzw. 15 mg/kg KG i.p. appliziert.

Der Vergleich mit den Kontrolltieren (Normalwert 21.3 µg mRNA/g Herz) zeigt eine erhebliche Abnahme des mRNA-Gehalts, nämlich um 36% auf 13.5 µg/g Herz bei 10 mg bzw. um 52% auf 10.3 µg/g Herz bei 15 mg/kg KG Adriamycin-Gabe.

Die mengenmäßige Abnahme myokardialer Polyribosomen mit nachfolgender Proteinsyntheseverminderung unter dem Einfluß von Adriamycin ist also - zumindest größtenteils - Folge einer drastischen Abnahme ihrer unmittelbaren Vorstufe, der mRNA (Tab. 2).

Die Abnahme der mRNA (-52%) ist weitaus drastischer, als die der Gesamt-RNS (-20%) und der mikrosomalen RNS (-13%). Das läßt den Angriffspunkt von Adriamycin eher an der DNS im Nucleus, dem Transskriptionsort der mRNA, als im Nucleolus, dem Syntheseort der rRNA, vermuten. Dies stünde in Übereinstimmung mit elektronenoptischen Beobachtungen (135).

3.8.2. Struktur myokardialer mRNA

Um eine zusätzliche Degradation der mRNA unter dem Einfluß von Adriamycin auszuschließen, wurde das Sedimentationsverhalten der myokardialen mRNA auf Sucrosegradienten untersucht.

Beim Vergleich mit Kontrolltieren zeigt sich keine Abweichung im Kurvenverlauf, wenn den Tieren 2 Wochen vorher 10 bzw. 15 mg/kg KG Adriamycin appliziert worden war.

Tabelle 2: Myokardialer Gehalt an mRNS und Polyribosomen
unter Adriamycin-Behandlung

Tiergruppe	mRNS ($\mu\text{g/g Herz}$)	%	Polyribosomen ($\mu\text{g/g Herz}$)	%
Kontrolle	21.3 ± 4.5	(15)	752 ± 84	(6)
Adriamycin				100
- 10 mg/kg KG	13.5 ± 3.4	(8)	511 ± 62	(6)
- 15 mg/kg KG	10.3 ± 4.2	(6)	489 ± 106	(5)

Dauer der Adriamycin-Behandlung: 2 Wochen
Werte = $\bar{x} \pm \text{SD}$ (Anzahl der Aufarbeitungen)

Somit kann von einer strukturellen Integrität der verbliebenen mRNA im Myokard ausgegangen werden, was wiederum eine erhöhte Ribonuclease-Aktivität als Ursache der verminderten Polyribosomenmenge ausschließt.

3.8.3. Funktionstüchtigkeit der mRNA

Eine verminderte Funktionstüchtigkeit der mRNA unter Adriamycin hätte unmittelbaren Einfluß auf die Proteinsynthese im Herzmuskel.

Es wurden daher gleiche Mengen myokardialer mRNA aus normalen und Adriamycin-behandelten Versuchstieren hinsichtlich ihrer Inkorporationsfähigkeit für ^3H -Leucin im Weizenkeimsystem S30 in-vitro untersucht. Den Versuchstieren war 2 Wochen vor dem Versuch 10 mg Adriamycin / kg KG verabreicht worden. Abb. 8 zeigt einen nahezu identischen Kurvenverlauf zwischen Adriamycin- und Kontrollgruppe. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Proteinsynthesekapazität der mRNA aus Adriamycin-behandelten und Kontroll-Tieren. Die Funktionstüchtigkeit der myokardialen mRNA ist unter Adriamycin daher nicht beeinträchtigt.

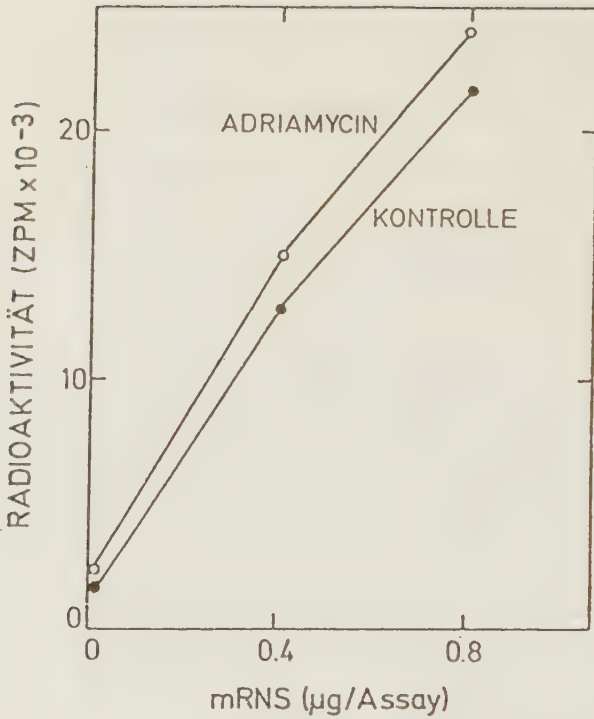


Abb. 8: Einfluß von Adriamycin auf die in-vitro Translationsfähigkeit myokardialer mRNS aus Adriamycin-behandelten (O—O) und Kontrolltieren (●—●). Der Versuch wurde mehrmals mit den gleichen Ergebnissen wiederholt.

3.9. Einfluß von Adriamycin auf die Zusammensetzung der in-vitro synthetisierten Proteine

Aus den beschriebenen Experimenten läßt sich eine globale Verringerung der Proteinsynthese im Herzmuskel unter Adriamycin, vorwiegend aufgrund einer deutlich verringerten mRNA-Synthese, ableiten. Dennoch könnten einige spezifische Gene selektiv betroffen sein. Von Interesse war insbesondere der Einfluß auf die kontraktilen Proteine des Myokards. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die mRNA-abhängige in-vitro-Synthese myokardialer Proteine analysiert und quantifiziert. Dies geschah mittels Gel-Elektrophorese und anschließender Fluorographie.

Zunächst wurden gleiche Mengen mRNA aus normalen und mit Adriamycin behandelten Tieren im Retikulozyten-Lysat-System inkubiert und translatiert. Die neusynthetisierten radioaktiven Proteine wurden in gleichen Mengen auf ein Polyacrylamid-Slabgel aufgetragen und durch Elektrophorese getrennt. Die Fluorographie in Abb. 9 zeigt, daß kein quantitativer Unterschied besteht zwischen den in vitro synthetisierten Proteinen aus myokardialer mRNA behandelter und unbehandelter Tiere. Daraus ergibt sich die Folgerung, daß kein wesentlicher Unterschied in der Zusammensetzung der mRNA-Fraktion aus Adriamycin- und Kontroll-Tieren bestehen kann. Somit hemmt Adriamycin

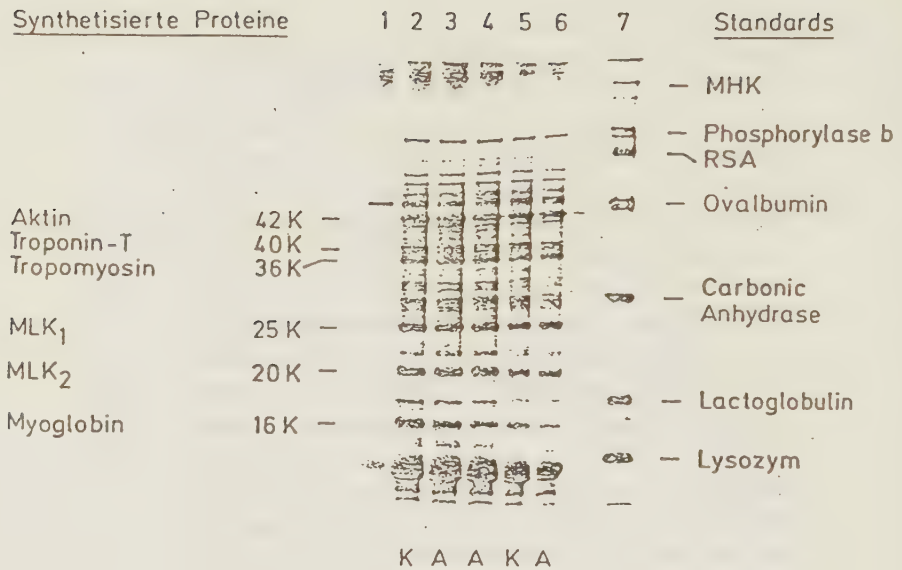


Abb. 9: Analyse der in-vitro synthetisierten Proteine myokardialer mRNS aus Kontroll- (K) und Adriamycin-behandelten (A) Tieren durch SDS-Polyacrylamid-Slabgel-Chromatographie und Fluorographie. Lauf 1 = Keine mRNS (12 000 Zpm), Lauf 2 = mRNS von Normaltieren (50 000 Zpm), Lauf 3 und 4 = mRNS von (A)-Tieren (49 400 bzw. 48 000 Zpm), Lauf 5 = mRNS von (K) (40 500 Zpm), Lauf 6 = mRNS von (A)-Tieren (45 700). Lauf 7 stellt eine Mischung von Standardproteinen dar. Behandlung: 10 mg/kg KG Adriamycin, 2 Wochen vor dem Versuch

die Synthese von mRNS an der nucleären DNS nicht selektiv, sondern global. Gene für bestimmte Proteine, vor allem die wichtigen kontraktilen Proteine, werden nicht selektiv betroffen, sondern relativ unspezifisch, im gleichen Ausmaß gehemmt.

3.10. Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse.
Entwicklung eines sich daraus ergebenden
Modells der biochemischen Pathogenese
der Adriamycin-Kardiomyopathie

Zusammenfassend stellen sich die erhaltenen Ergebnisse wie folgt dar (Abb.10):

Die reduzierte Proteinsynthese im Herzmuskel der Versuchstiere unter Adriamycin beruht vor allem auf einem quantitativen Mangel der benötigten Ribonucleinsäuren.

Die Menge an myokardialer Gesamt-RNS hat um 20% und an rRNS um 13% abgenommen.

Im Gegensatz zu diesen relativ geringen Auswirkungen nimmt der Gehalt an Polyribosomen um 35%, der der mRNS um bis zu 52% ab.

Diese Abnahme erfolgt bei voller struktureller und funktioneller Integrität der verbliebenen Polyribosomen und mRNS. Ein wesentlicher Einfluß von Ribonuclease kann daher ausgeschlossen werden. Unter dem Einfluß von Adriamycin sinkt die Aktivität der pH 5 Enzym-Fraktion um 31%, die in-vivo-Proteinsyntheserate um 30%.

Die quantitativ unterschiedlichen Auswirkungen auf die im Nucleus (mRNS -52%) bzw. im Nucleolus (rRNS -13%) zu synthetisierende RNS lassen den Schluß zu, daß Adriamycin seine Wirkung vornehmlich an der DNS des Zellkerns entfaltet und dort die Transskription inhibiert. Hervorzuheben bleibt, daß diese Bindung von Adriamycin an die DNS und die darauffolgende

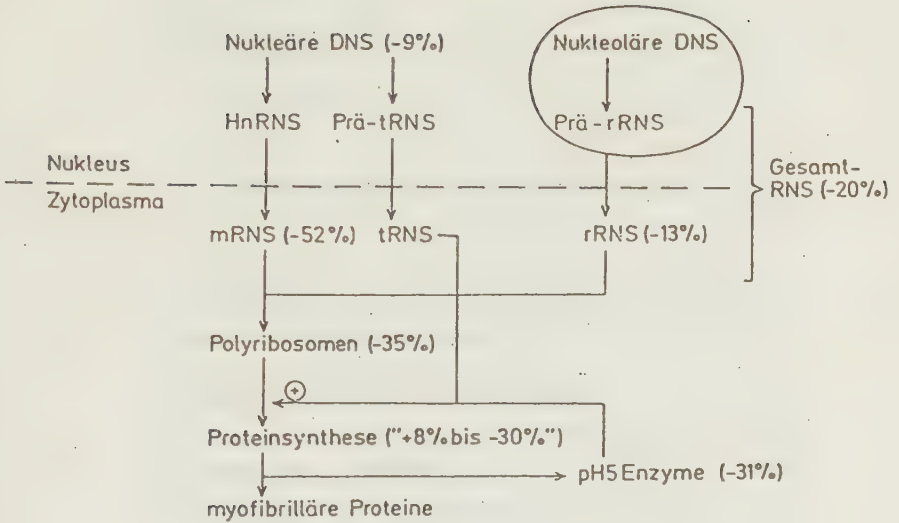


Abb. 10: Zusammenschau aller in den vorher beschriebenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse und Veränderungen des Nucleinsäurestoffwechsels im Herzen unter Adriamycin-Einfluß.

Inhibierung der Transskription nach unseren Untersuchungen völlig unselektiv ist und sich keine Anzeichen dafür ergeben haben, daß die wichtigen kontraktilen Proteine des Herzmuskels bevorzugt betroffen werden.

Aus dieser Zusammenfassung ergibt sich folgendes postuliertes biochemisches Modell der verzögerten Adriamycin-Kardiomyopathie (Abb.11):

Durch die Bindung von Adriamycin an die myokardiale DNS werden sowohl die DNS-Replikation und Reparation selbst, als auch vor allem die Transskription, die DNS-abhängige RNS-Synthese, global beeinträchtigt. Dadurch erniedrigt sich, ohne Einwirkung abbausteigernder Prozesse, der Gehalt an mRNS, Gesamt-RNS und Polyribosomen. Auf dem Weg der nachfolgend verminderten Proteinsynthese wird auch die Aktivität der pH-5-Enzyme vermindert. Dies führt zu einer global verminderten Proteinsynthese im Herzmuskel, ohne daß dabei bestimmte, vor allem die kontraktilen Proteine, besonders betroffen sind.

Der Rückgang der Proteinsynthese führt zum Verlust der strukturellen und funktionellen Integrität des Myokards. Dies kann zur Erklärung einer Vielzahl der beobachteten klinischen Erscheinungen der verzögerten Adriamycin-Kardiomyopathie herangezogen werden. Insbesondere ist dieses pathogenetische Modell geeignet, die zum Teil große Latenz zwischen Applikation von Adriamycin und dem Auftreten erster klinischer Symptome zu verstehen.

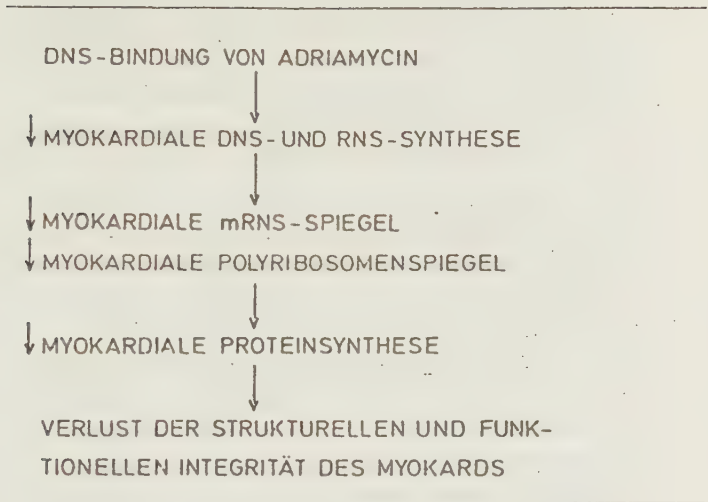


Abb. 11: POSTULIERTE, BIOCHEMISCHE PATHOGENESE DER
ADRIAMYCIN-KARDIOMYOPATHIE

4. Diskussion

Zur biochemischen Genese der verzögerten Adriamycin-Kardiomyopathie wurde bisher eine Reihe von Hypothesen aufgestellt, ohne daß sie hinreichend und eindeutig geklärt werden konnte (92,208). So reichen nach Ansicht mancher Autoren (92) die Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels (58,104,194,206), Peroxidation von Membranlipiden (18,140,161) mit Verschlimmerung unter Selen-freier Ernährung, die Aktivitätsabnahme der Succinoxidase und NADH-Oxidase (127), die Funktionsminderung der mitochondrialen Atmungskette (65,110,127), Histamin- und Katecholamin-vermittelte Störungen (57) allenfalls hin, die akuten Nebenwirkungen von Adriamycin am Herzen zu erklären, keinesfalls aber, oder zumindest nicht ausreichend, um die verzögert auftretende Kardiomyopathie zu erklären.

Wesentlich verständlicher werden sowohl Latenz als auch Schwere der Erkrankung, wenn man sie auf einen Einfluß von Adriamycin auf den Nucleinsäure- und nachfolgend Proteinstoffwechsel zurückführt, wie es für die zytostatische Wirkung nachgewiesen ist (83).

So wird in der Literatur über eine Interaktion zwischen Adriamycin und myokardialer DNS

(59,64,80), eine Inhibierung der DNS-Reparationsmechanismen (94), verminderten Einbau von Präkursoren in die DNS und RNS (5,8,9, 10,56,100,177,178,179,215) sowie in myokardiales Protein (10) berichtet. Aus dieser Sicht betrachten mehrere Autoren die Störung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels als die wesentliche Ursache der Adriamycin-Kardiomyopathie.

Die vorliegende Arbeit legt detaillierte Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von Adriamycin auf die myokardiale DNS, RNS, mRNS, Polyribosomen, pH-5-Enzyme und die Proteinsynthese vor.

Die Abnahme der Polyribosomen (-35%) und der mRNS (-52%) wie auch der Aktivitätsverlust um 31% bei den pH-5-Enzymen passen gut in das Bild der letztgenannten Hypothese. Sie erklären den hier und von anderen Autoren (9) beobachteten Rückgang der Proteinsynthese im Herzmuskel in-vivo (Kap. 3.4.).

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gibt es keine Anzeichen einer pathologischen Degradation der Nucleinsäuren nach Adriamycin-Behandlung (3.6.2., 3.7., 3.8.2.). So erscheint eine verminderte Proteinsynthese aufgrund globaler Hemmung der Transskription im Zellkern als wichtigste Ursache für den Verlust der strukturellen und funktionellen Integrität des Myokards naheliegend.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (59,63, 64,80) unterstützen diese Ergebnisse die These, daß an die DNS gebundenes Adriamycin die DNS-abhängige RNS-Synthese inhibiert und dieser Prozeß mit all seinen Folgestörungen im Nucleinsäure-und Proteinstoffwechsel der ätiologisch entscheidende Faktor der Adriamycin-Kardiomyopathie im Tierversuch ist.

5. Zusammenfassung

Schon bald nach seiner Entdeckung wurde das Anthracyclin-Antibiotikum Adriamycin aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums und seiner hervorragenden Potenz weltweit als Zytostatikum zur Therapie vieler neoplastischer Erkrankungen eingesetzt. Es ist aus der heutigen Tumorthherapie nicht wegzudenken (1.1; 1.3).

Die häufigsten klinischen Nebenwirkungen sind Alopezie, Stomatitis, Knochenmarksdepression und gastrointestinale Störungen (1.4.1.).

Besonders gravierend sind jedoch Nebenwirkungen am Herzen (1.4.2.): Zum einen treten Dosis-unabhängige, akute, reversible und relativ harmlose EKG-Veränderungen auf (1.4.2.1.). Wichtiger und Therapie-limitierend ist jedoch die Entstehung einer Dosis-abhängigen, verzögerten, chronischen, oft therapieresistenten, irreversiblen und lebensgefährlichen Kardiomyopathie bei 1.7% aller Patienten, die in etwa 60% der Fälle tödlich endet (1.4.2.2.).

Zur Erklärung der Pathogenese der Adriamycin-Kardiomyopathie wurde eine Reihe von Hypothesen aufgestellt (1.10.), die jedoch zum größten Teil nur geeignet sind, die akuten Nebenwirkungen am Herz verständlich zu machen. Für die Entstehung der verzögerten Adriamycin-Kardiomyopathie kommt vor

allem die Ansicht in Frage, daß Adriamycin in die myokardiale DNS interkaliert, was zu einer Inhibierung der DNS-abhängigen Nucleinsäure- und Proteinsynthese führt.

Zur Überprüfung dieser Ansicht wurde am Modell der Ratte der Einfluß von Adriamycin auf den Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel des Herzens untersucht. Dabei war es im Rahmen dieser Untersuchungen erstmals gelungen, strukturell intakte und biochemisch voll funktionstüchtige mRNA aus Herzmuskelgewebe zu isolieren (2.9.).

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind eine drastische Abnahme der myokardialen mRNA (-52%) und der myokardialen Polyribosomen (-35%), sowie eine Aktivitätsminderung der myokardialen pH-5-Enzyme um 31% und der myokardialen in-vivo-Proteinsyntheserate um 30%. Weniger deutlich fiel die Abnahme von DNS (-9%), Gesamt-RNS (-20%) und Gesamt-Protein (-6%) aus.

rRNS, mRNA und Polyribosomen zeigten weder Strukturveränderungen noch Funktionseinbußen.

Die in-vitro unter der Direktion von mRNA oder Polyribosomen synthetisierten Proteine zeigten nach Adriamycin-Behandlung keine Veränderung in ihrem Verteilungsmuster.

Dies läßt darauf schließen, daß Adriamycin eine globale Hemmung der DNS-abhängigen Transskription im Nucleus des Herzmuskels bedingt hatte. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist hierin der pathogenetisch ausschlaggebende Mechanismus für das Entstehen der Adriamycin-Kardiomyopathie zu sehen.

6. Literatur

- 1) Alexander, J., N. Dainiak et al.: Serial assessment of doxorubicin cardiotoxicity with quantitative radionuclide angiography, N. Engl. J. Med. 300: 269 (1979)
2. Al-Ismail, S.A.D., D.H. Parry et al.: Anthracycline cardiotoxicity and acute myelogenous leukaemia. Brit. med. J. 1: 815 (1977)
3. Arcamone, F., G. Franceschi et al.: The structure of daunomycin. Tetrahedron Lett 30: 3349-3352 (1968)
4. Arcamone, F., G. Cassinelli et al.: The total absolute configuration of daunomycin. Tetrahedron Lett 30: 3353-3356 (1968)
5. Arcamone, F., G. Cassinelli et al.: British Patent Application, Farmitalia Research Laboratories (1969)
6. Arcamone, F., G. Cassinelli et al.: Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin), in Intern. Sympos. on Adriamycin, ed. by Carter SK., A. Di Marco, M. Ghione et al., New York, Springer-Verl., Inc., 9-22 (1972)

- 7) Arena, E., N. D'Alessandro et al.: Analysis of the pharmacokinetics, pharmacological and chemotherapeutic activity of 14-hydroxy-daunomycin (Adriamycin), a new drug endowed with an antitumor activity. *Arzneim.-Forsch.* 21 Nr. 8: 1258 (1971)
- 8) Arena, E., N. D'Alessandro et al.: Influence of pharmacokinetic variations on the pharmacological properties of adriamycin. In *Intern. Symp. on Adriamycin* (Carter SK, A. Di Marco, M. Ghion, et al. eds.) New York, Springer-Verlag: 96-116 (1972)
- 9) Arena, E., F. Biondo et al.: DNA, RNA and protein synthesis in heart, liver and brain of mice treated with daunomycin or adriamycin. *IRCS libr. Compend.* 2 (1): 1053 (1974)
- 10) Arena, E., N. D'Alessandro et al.: Adriamycin and daunomycin induced cardiotoxicity. Effects on DNA, RNA and protein synthesis in mouse heart after strophanthin pretreatment. *IRCS Med. Sci.: Libr. Compend.* 3: 190 (1975)
- 11) Atwood, G., R. Boerth et al.: Effects of adriamycin on myocardial Na-K-ATPase. *Circulation* 56: III 157 (1977)
- 12) Aviv, H. and Ph. Leder et al.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acidcellulose. *PNAS USA* 69: 1408-1412 (1972)

- 13) Bachur, N., A. Moore et al.: Tissue distribution and disposition of daunomycin (NSC-82151) in mice: Fluorometric and isotopic methods. Cancer Chemother. Rep. 54: 89-94 (1970)
- 14) Bachur, N., M.J. Egorin et al.: Human biliary metabolites of adriamycin and daunorubicin (abstract). Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 14: 56 (1973)
- 15) Bachur, N., R.C. Hildebrand et al.: Adriamycin and daunorubicin disposition in the rabbit. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 191, 2: 331 (1974)
- 16) Bachur, N.R.: Adriamycin (NSC-123 127) Pharmacology. Cancer Chemother. Rep. Part 3 Vol. 6, No. 2: 153 (1975)
- 17) Bachur, N., W. Reiter et al.: Cardiac uptake of adriamycin (NSC-123127) not affected by strophanthin G (NSC.25485). Cancer Chemother. Rep. 59: 765-766 (1975)
- 18) Bachur, N., S.L. Gordon et al.: A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. Cancer Res. 38: 1745 (1978)

- 19) Bajpai, P.K., D.J. Slanczka: Anaphylactic heart failure in adriamycin (NSC 123127) treated rabbits. IRCS Med.Sci. 5: 363 (1977)
- 20) Balcerzak, S.P., J. Christakis et al.: Systolic time intervals in monitoring adriamycin-induced cardiotoxicity. Cancer Treatment Reports 62 No. 6: 893 (1978)
- 21) Baliga, B., A. Pronczuk et al.: Regulation of polysome aggregation in a cellfree system through amino acid supply. J. Mol. Biol. 34: 199-218 (1968)
- 22) Bantle, J., J. Maxwell et al.: Specificity of oligo-(dT)-cellulose chromatography in the isolation of polyadenylated RNA. Analytical Biochemistry 72: 413-427 (1976)
- 23) Benjamin, R.S., D.H. Huffman et al.: Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin patients with hematologic neoplasmas and other malignancies (abstract no. 508), in XIV Intern. Congr. of Hematol., Sao Paulo, Brazil, 16-21 July (1972)
- 24) Benjamin, R.S., C.E. Riggs jun. et al.: Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin in man. Cli. Pharmacol. Ther. 14: 592 (1973)

- 25) Benjamin, R.S., P.H. Wienik et al.: Adriamycin chemotherapy - clinical and pharmacologic correlation. Cancer 33: 19-27 (1974)
- 26) Benjamin, R.S., P.H. Wiernik et al.: Adriamycin chemotherapy. Efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule. Cancer (Philadel.) 33: 19 (1974)
- 27) Benjamin, R.S., Riggs C.E. jun. et al.: Significance of Adriamycin (A) metabolism in patients with liver disease (Abstract). In Proc. 11th Intern. cancer Congr. Florence, Oct 20-26, Vol 4: 751 (1974)
- 28) Benjamin, R.S.: Clinical Pharmacology of Adriamycin (NSC-123127). Cancer Chemother. Rep. Part 3 Vol. 6 No. 2: 183 (1975)
- 29) Benjamin, R.S.: A practical approach to Adriamycin (NSC-123127) toxicology. Cancer Chemother. Rep. Part 3 Vol. 6 No. 2: 191 (1975)
- 30) Benjamin, R.S., M.A. Burgess et al.: A Phase I-II Study of Adriamycin-DNA Complex (A-DNA). Proc AACR and ASCO, 18: 305 (1977)

- 31) Benjamin, R.S.: Adriamycin and other anthracycline antibiotics under study in the United States. Recent Results in Cancer Research 63: 230 (1978)
- 32) Benjamin, R.S., J.W. Mason et al.: Cardiac toxicity of Adriamycin-DNA Complex and Rubidazone: Evaluation by electrocardiogram and endomyocardial biopsy. Cancer Treatment Reports Vol. 62 No. 6: 935 (1978)
- 33) Benjamin, R.S.: Clinical strategy for evaluation of anthracycline analogues. Recent Results in Cancer Research 70: 67 (1980)
- 34) Bertazzoli, C., T. Chieli et al.: Chronic toxicity of adriamycin: a new antineoplastic antibiotic. Toxicol Appl Pharmacol 21: 287-301 (1972)
- 35) Bertazzoli, C., I. Dell'Oro et al.: Adriamycin: experimental cardiotoxicity on the rabbit. IRCS Med. Sci. 2: 1454 (1974)
- 36) Bertazzoli, C., O. Bellini et al.: Experimental cardiotoxicity of adriamycin. Abstr. XI. Int. Cancer Congr., Florence, Oct. (1974)

- 37) Bertazzoli, C., L. Sala et al.: Experimental adriamycin cardiotoxicity prevented by ubiquinone in vivo in rabbits. *Int. Res. Commun. Sys. Med. Sci.* 3: 468 (1975)
- 38) Bertazzoli, C., M. Ghione et al.: Adriamycin associated cardiotoxicity: research on prevention with coenzyme Q. *Pharmacol. Res. Commun.* 9: 235 (1977)
- 39) Billingham, M.E., M.R. Bristow et al.: Adriamycin cardiotoxicity: Endomyocardial biopsy evidence of enhancement by irradiation. *Am J Surg Pathol* 1: 17-23 (1977)
- 40) Billingham, M.E., J.W. Mason et al.: Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treatment Report* 62: 865-872 (1978)
- 41) Blobel, G., V.R. Potter: Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. *J. Mol. Biol.* 26: 279-292, 293-301 (1967)
- 42) Bloom, K.R., R.M. Bini et al.: Echocardiography in adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 41: 1265-1269 (1978)
- 45) Blum, R.H., M.A. Friedmann et al.: Adriamycin NSC-123127, Clinical Brochure, March (1972)

- 44) Blum, R., S.K. Carter; A new anticancer drug with significant clinical activity. Annals of internal Medicine 80: 249 (1974)
- 45) Blum, R.H.: An overview of studies with adriamycin (NSC-123127) in the United States. Cancer Chemother. Rep. 6: 247 (1975)
- 46) Blumenschein, G.R., J.O. Cardenas et al.: FAC chemotherapy for breast cancer. Proc. of AACR and ASCO 15: 193 (1974)
- 47) Bonadonna, G., S. Monfardini: Cardiac toxicity of daunorubicin. Lancet I: 837 (1969)
- 48) Bonadonna, G., S. Monfardini et al.: Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumor antibiotic. Br Med J 3: 503-506 (1969)
- 49) Bonadonna, G., S. Monfardini et al.: Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC-123127). Cancer Research 30: 2572-2582 (1970)
- 50) Bonadonna, G., S. Monfardini et al.: Clinical trials with adriamycin. Results of a three year study. In Intern. symposium on Adriamycin, edited by Carter, S.K., A. Di Marco et al. New York, Springer-Verlag, Inc.: 139-152 (1972)

- 51) Bonadonna, G., G. Beretta et al.: Adriamycin (NSC-123127) studies at the Istituto Nazionale Tumori, Milan. Cancer Chemother Rep Part 3 Vol 6: 231-245 (1975)
- 52) Bonner, W., R. Laskey et al.: A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88 (1974)
- 55) Brauerman, G.: Eukaryotic messenger RNA. Am Rev. Biochem. 43: 621-642 (1974)
- 54) Bristow, M.R., M.E. Billingham et al.: Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. Cancer Treatment Reports 62 No 6: 873-879 (1978)
- 55) Bristow, M.R.: Endomyocardial Biopsy and Systolic Time Intervals in Detection of Adriamycin Cardiotoxicity. Circulation 53/54 Supp. II, II-80 (1976)
- 56) Bristow, M.R., J.W. Mason et al.: Doxorubicin cardiomyopathy: Evaluation by phonocardiography, endomyocardial biopsy, and cardiac catheterization. Ann Intern Med 88: 168-175 (1978)
- 57) Bristow, M.R., M.E. Billingham et al.: Histamine and catecholamines mediate adriamycin cardiotoxicity. Proc. AACR and ASCO 20: 118 (1979)

- 58) Bühner, R., S. Biedert et al.: Erhöhung des frei-ionisierten zytoplasmatischen Calciums als Ursache der Adriamycin-Kardiomyopathie. Klin. Wschr. 58: 747-748 (1980)
- 59) Buja, L.M., V.J. Ferrans et al.: Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy. Cancer 32: 771-788 (1973)
- 60) Buja, L.M., V.J. Ferrans et al.: Letter: Unusual nuclear alterations. Lancet 1: 402-403 (1974)
- 61) Burg, J.R., H. Moseley et al.: Evaluation of cardiac function during adriamycin therapy. J Surg Oncol 6: 519-529 (1974)
- 62) Buzdar, A.U., S.S. Legha et al.: Adriamycin and mitomycin C: Possible synergistic cardiotoxicity. Cancer Treat Rep 62: 1005-1008 (1978)
- 63) Byfield, J.: Molecular origins of cell death induced by cyclophosphamide, adriamycin and X-rays. 67th Amer. Meet. of AACR and ASCO, May 4-8, Toronto, Abstract 106 (1976)
- 64) Calendi, E., A. Di Marco et al.: On physico-chemical interactions between daunomycin and nucleic acids. Biochim Biophys Acta 103: 25-49 (1965)
- 65) Cargill, C., E. Bachmann et al.: Effects of daunomycin and anthramycin on Electrocardiogramm and mitochondrial metabolism of the rat heart. J. Natl. Cancer Inst. 53: 481 (1974)

- 66) Carter, S.K.: Adriamycin. A review. J. Natl. Cancer Inst. 55: 1265 (1975)
- 67) Carter, S.K.: Adriamycin (NSC-123127) - Thoughts for the Future. Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6, No. 2: 389 (1975)
- 68) Chang, P., C.E. Riggs et al.: Combination chemotherapy with adriamycin and streptozotocin. Clin. Pharmacol. Ther. 20: 611 (1976)
- 69) Cortes, E.P., J.F. Holland et al.: Doxorubicin in disseminated osteosarcoma, JAMA 221: 1132-1138 (1972)
- 70) Cortes, E.P., J.F. Holland et al.: Amputation and adriamycin in primary osteosarcoma. N. Engl J Med 294: 998 (1974)
- 71) Cortes, E.P., J.F. Holland et al.: Amputation and adriamycin in primary osteogenic sarcoma. Proc AACR and ASCO 15: 170 (1974)
- 72) Cortes, E.P., G. Lutman et al.: Adriamycin (NSC-123127) cardiotoxicity: a clinicopathologic correlation. Cancer Chemother Rep Part 3, Vol 6 (2): 215-225 (1975)

- 73) Cortes, E.P., M. Gupta et al.: Coenzyme Q10 (CoQ10) and the prevention of adriamycin (ADM) cardiotoxicity. Proc of AACR and ASCO 19: 341 (1978)
- 74) Cortes, E.P., M. Gupta et al.: Adriamycin cardiotoxicity: early detection by systolic time interval and possible prevention by Coenzyme Q10. Cancer Treat Rep 62, No 6: 887 (1978)
- 75) Darnell, S.: mRNA structure and function. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 19. W. Cohn + E. Volkin, Eds, pp. 493-511 New York: Academic Press (1976)
- 76) De Duve, C., A. Trouet: Lysosomes and lysosomotropic drugs in host-parasite relationship. In "Non-specific" Factors Influencing Host Resistance (Braun W. and Ungar J. eds). Basel, S. Karger: 153-170 (1973)
- 77) Denine, E.P., L.M. Schmidt: Adriamycin-induced myopathies in the rhesus monkey with emphasis on cardiomyopathy. Proc Med Soc Toxicol, Abstr. S1 (1975)
- 78) Di Marco, A., M. Gaetani et al.: Studi sperimentali sull'attività antineoplastica del nuovo antibiotico daunomicina. Tumori 49: 203-215 (1963)

- 79) Di Marco, A.: Daunomycin and related antibiotics. in Antibiotics (Gottlieb, D. and Shaw P.D. eds), Heidelberg, Springer-Verlag, Vol. 1: 190 (1967)
- 80) Di Marco, A.: Daunomycin pharmacological activity at the cellular level. Path. Biol. 15: 897-902 (1967)
- 81) Di Marco, A., F. Zunino et al.: Interaction of some daunomycin derivates with deoxyribonucleic acid and their biological activity. Biochem Pharmacol 20: 1323-1328 (1971)
- 82) Di Marco, A.: Daunomycin (daunorubicin) and adriamycin. Handbook Exp. Pharmacol. 38: 593 (1975)
- 83) Di Marco, A.: Adriamycin (NSC-123127): Mode and mechanism of action. Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol.6: 91-106 (1975)
- 84) Driscoll, J.S., G.F. Hazard et al.: Structure-antitumor activity relationships among quinone derivates. Cancer Chemother. Rep. Part 2, Vol. 4 (2): 1-362 (1974)
- 85) Driscoll, H., M. Crim et al.: Hepatic synthesis and urinary excretion of a₂u-globulin by male rats: Diurnal rhythm and response to fasting and re-feeding. J. Nutrition 108: 1691 (1978)

- 86) Egorin, M.J., R.C. Hildebrand et al.: Cytofluorescence localisation of adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res* 34: 2243-2245 (1974)
- 87) Eltringham, J.R., L.F. Fajardo et al.: Adriamycin Cardiomyopathy: Enhanced cardiac damage in rabbits with combined drug and cardiac irradiation. *Radiology* 115: 471-472 (1975)
- 88) Ewy, G.A., S.E. Jones et al.: Echocardiographic diagnosis of adriamycin heart disease. *Western Section Oncology* 115A (Abstract)
- 89) Ewy, G.A., S. E. Jones et al.: Noninvasive cardiac evaluation of patients receiving adriamycin. *Cancer Treat Rep* 62: 915-922 (1978)
- 90) Faust, G., H. Diggelmann et al.: Isolation of poly-adenylic-acid rich RNA from mouse myeloma and synthesis of complementary DNA. *Biochemistry* 12: 925-931 (1973)
- 91) Ferrans, V.J.: Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* 62: 955-961 (1978)
- 92) Ferrans, V.J., Hermann E.: Cardiomyopathy induced by antineoplastic drugs. In: Kaltenbach, M., Loogen, F., Olsen, E. (Eds): *Cardiomyopathy and myocardial Biopsy*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 12-26 (1978)

- 93) Fetzner, S., D. Füllenbach et al.: Adriamycin, Vol 2 (Solide Tumoren und Hämoblastosen), Kehrler Verlag (1978)
- 94) Fialkoff, H., M. Goodman et al.: Differential effect of adriamycin on DNA replicative and repair synthesis in cultured neonatal rat cardiac cells. Cancer Res 39: 1321-1327 (1979)
- 95) Fioretti, A., A. Sanfilippo et al.: IRCS 2: 1711 (1974)
- 96) Fioretti, A., M. Ghione et al.: Autoantibodies and spleen cell mediated cytotoxicity in adriamycin induced myocarditis in rabbits Cancer Res. 36: 1462 (1976)
- 97) Fleckenstein, A., J. Janke et al.: Ca overload as the determinant factor in the production of catecholamine-induced myocardial lesions. In: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. Baltimore, University Park Press, Vol. 2: 455-466 (1973)
- 98) Folkers, K., T. Watanabe et al.: Biomedical and Clinical Research on Coenzyme Q in Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q. Folkers, K., Yamamura, Y. (eds), Amsterdam, Elsevier Scientific: 229 (1977)
- 99) Folkers, K., J.Y. Choe et al.: Rescue by Coenzyme Q10 from electrocardiographic abnormalities caused by the toxicity of adriamycin in the rat. PNAS 75: 5178 (1978)

- 100) Formelli, F., M. Zedeck et al.: Effect of adriamycin on DNA synthesis in mouse and rat heart. *Cancer Res.* 38: 3286-3292 (1978)
- 101) Frei, E., J.K. Luce et al.: Clinical trials of adriamycin. In: *Intern. Symposium on Adriamycin*, ed. by Carter, S.K., Di Marco, A., Ghione, M., et al. New York, Springer-Verlag Inc.: 153-160 (1972)
- 102) Friedberg, C.K.: *Diseases of the Heart*, 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1966)
- 103) Fulkerson, P.K., R. Talley et al.: Noninvasive profile in the prospective monitoring of adriamycin cardiomyopathy. *Cancer Treat Rep* 62 (2): 881 (1978)
- 104) Gamulin, S., H. Gray et al.: Comparison of methods for preparing polysomes free of glycogen. *Biochim Biophys Acta* 259: 239-242 (1972)
- 105) George, S.L., R.J.A. Aur et al.: A reappraisal of the results of stopping therapy in childhood leukemia. *N Engl J Med* 300: 269 (1979)
- 106) Ghione, M.: Development of Adriamycin (NSC-123127). *Cancer Chemother Rep Part 3*, Vol. 6, No. 2: 83 (1975)
- 107) Ghione, M.: Cardiotoxic effects of antitumor agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1: 25-34 (1978)

- 108) Gilladoga, A.C., C. Manuel et al.: The cardiotoxicity of adriamycin and daunomycin in children. *Cancer (Phiad.)* 37: 1070 (1976)
- 109) Gilham, P.: The synthesis of polynucleotide-cellulose and their use in the fractionation of polynucleotides. *J Mol Chem Soc* 86: 4982-4989 (1964)
- 110) Gosalvez, M., M. Blanco et al: Effects of anti-cancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells. *Eur. J. Cancer* 10: 567-574 (1974)
- 111) Gosalvez, M., G.D.V. Van Rossum et al.: Inhibition of sodium-potassium-activated adenosine 5-triphosphatase and ion transport by adriamycin. *Cancer Res* 39: 257 (1979)
- 112) Gottlieb, J.A., C.S. Hill et al.: Chemotherapy of thyreoid cancer. *Cancer* 30: 848-853 (1972)
- 113) Gottlieb, J.A., E.A. Lefrak et al.: Fatal adriamycin cardiomyopathy: prevention by dose limitation (abstract). *Proc AACR* 14: 88 (1973)
- 114) Gottlieb, J.A., C.S. Hill jun.: Chemotherapy of thyroid cancer with adriamycin. Experience with 30 patients. *N Engl J Med* 290: 193-197 (1974)

- 115) Gottlieb, J.A., L.H. Baker et al.: Adriamycin (NSC 123127) used alone and in combination for soft tissue and bony sarcomas. Cancer Chemother Rep Part 3, Vol. 6, No. 2: 271-282 (1975)
- 116) Greco, F.A.: Subclinical adriamycin cardiotoxicity: Detection by timing the arterial sounds. Cancer Treat Rep 62: 901-905 (1978)
- 117) Gupta, M., E.P. Cortes et al.: Systolic time interval in adriamycin-treated patients on digoxin or prednison cardioprophylaxis: Proc. ASCO, Toronto, Abstract (1976)
- 118) Hartmann, G., H. Goller et al.: Biochem. Z. 341: 126-128 (1964)
- 119) Henderson, I.C., M. Billingham et al.: Comparative cardiotoxicity studies with adriamycin (ADR) and AD 32 in rabbits. Proc. AACR and ASCO 19: 158 (1978)
- 120) Henderson, I.C., L.J. Sloss et al.: Serial studies of cardiac function in patients receiving adriamycin. Cancer Treat Rep 62 (6): 923 (1978)
- 121) Henderson, I.C., E. Frei: Adriamycin cardiotoxicity. American Heart Journal 99 (5): 671-674 (1980)
- 122) Herrmann, R.: Die Adriamycin-Kardiomyopathie. Dtsch. med. Wschr. 102, 1820-1822 (1977)

- 123) Heywood, S., R. Rowben et al.: The identification of polyribosomes synthesizing myosin. PNAS 57: 1002-1009 (1976)
- 124) Höfling, B., H.-D. Bolte: Kardiologische Betreuung von Patienten unter Adriamycin-Therapie. (Editorial) Onkologie 4: 174-178 (1981)
- 125) Irwin, D., A. Kunwar et al.: Messenger ribonucleo protein complexes isolated with oligo-(dT)-cellulose chromatography from kidney polyosomes, Cell 4, 157-165 (1975)
- 126) Israel, M., E.J. Modest et al.: N-Trifluoroacetyl Adriamycin-14-valerate, an analog with greater experimental antitumor activity and less toxicity than adriamycin. Cancer Res 35: 1365 (1975)
- 127) Iwamoto, Y., I.L. Hansen et al.: Inhibition of coenzyme-Q10-enzymes, succinoxidase and NADH-oxidase, by adriamycin and other quinones having antitumor activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58: 633-638 (1974)
- 128) Jacquillat, C., M. Weil et al.: Treatment of acute myeloblastic leukemia with RP 22050. BR Med J 4: 468-469 (1972)
- 129) Jaenke, R.S.: An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. Lab Invest 30: 292-304 (1974)

- 130) Jaenke, R.S.: Delayed and progressive myocardial lesions after adriamycin administration in the rabbit. *Cancer Res.* 36: 2958-2966 (1976)
- 131) Jones, S.E., G.A. Ewy et al.: Echocardiographic detection of adriamycin heart disease. *Proc. AACR and ASCO* 16: 288 (1975)
- 132) Kennedy, J.W., S.G. Sorensen et al.: Radio-nuclide angiography for the evaluation of anthracycline therapy. *Cancer Treat Rep* 62 (6): 941 (1978)
- 133) Kushner, J.P., V.L. Hansen et al.: Cardiomyopathy after widely separated courses of adriamycin exacerbated by actinomycin-D and mithramycin. *Cancer (Philad.)* 36: 1577-1584 (1975)
- 134) Lamberthengi-Deliliers, G.: Ultrastructural alterations induced in hepatic cellnucleoli by adriamycin, In: *Intern. Symp. on Adriamycin*, ed. by Carter, S.K., Di Marco, A., Ghione, M., et al. New York, Springer-Verlag, Inc.: 26-34 (1972)
- 135) Lamberthengi-Deliliers, G., PL. Zanon et al.: Myocardial injury induced by a single dose of adriamycin: an electron microscopic study. *Tumori* 62: 517-528 (1976)

- 136) Langslet, A., I. Oye et al.: Decreased cardiac toxicity of adriamycin and daunorubicin when bound to DNA. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 35: 379-385 (1974)
- 137) Lefrak, E.A., J. Pitha et al.: A clinico-pathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32: 302-314 (1973)
- 138) Lefrak, E.A., J. Pitha et al.: Adriamycin (NSC-123127) cardiomyopathy. *Cancer Chemother Rep Part 3*, Vol. 6: 203-208 (1975)
- 139) Lenaz, L. and Page, J.A.: Cardiotoxicity of adriamycin and related anthracyclines. *Cancer Treat Rep* 3: 111-120 (1976)
- 140) Locker, G.Y., J.H. Doroshow et al.: Glutathione peroxidase: its role in adriamycin cardiotoxicity. *Abstr. 348 AACR, 68th Meet., Denver (Colorado), May 18-21 (1977)*
- 141) Long, H.J.: Systolic time intervals: An effective measure of cardiac function in anthracycline-induced cardiomyopathy of rabbits. *Cancer Treat Rep* 62 (6): 911-914 (1978)
- 142) Lowry, O., N. Rosebrough et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265 (1951)

- 143) Maizel, J.: Methods Virol 5, Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins: 179-246 (1971)
- 144) Malpas, J.S., R.B. Scott: Daunorubicin in acute myelocytic leukemia. Lancet: 469 (1969)
- 145) Mans, R., G. Novelli: Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disc method. Arch Biochem Biophys 94: 48-53 (1961)
- 146) Marmont, A.M., E. Damasio et al.: Cardiac toxicity of Daunorubicin. Lancet: 837 (1969)
- 147) Mason, J.W., M.R. Bristow et al.: Invasive and noninvasive methods of assessing adriamycin cardiotoxic effects in man: superiority of histopathologic assessment using endomyocardial biopsy. Cancer Treat Rep 62 (6): 857-864 (1978)
- 148) Mason, J.W., M.E. Billingham: Myocardial biopsy Progress in Cardiology, 9: 113 (1980)
- 149) Mathé, J.W., L. Schwarzenberg et al.: Acute lymphoblastic leukemia treated with a combination of prednison, vincristine and rubidomycin. Lancet II: 380 (1967)

- 150) McKelvey, E.M., J.A. Gottlieb et al.: Treatment of non-Hodgkins lymphoma with hydroxyl-daunomycin (adriamycin) combination chemotherapy. *Poc. AACR and ASCO* 15: 184 (1974)

- 151) Meriwether, W.D., N.R. Bachur: Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L1210 mouse leukemia. *Cancer Res.* 32: 1137-1142 (1972)

- 152) Merrill, J., F.A. Greco et al.: Adriamycin and radiation: Synergistic cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 82: 122 (1975)

- 153) Middleman, E., J.K. Luce et al.: Clinical trials with adriamycin. *Cancer* 28: 844 (1971)

- 154) Minow, R.A., Benjamin, R.S. et al.: Adriamycin (NSC 123127) cardiomyopathy - An overview with determination of risk factors. *Cancer Chemother Rep Part 3. Vol. 6*: 195-201 (1975)

- 155) Minow, R.A., R.S. Benjamin et al.: Adriamycin cardiomyopathy - risk factors. *Cancer* 39: 1397-1402 (1977)

- 156) Minow, R.A., R.S. Benjamin et al.: QRS voltage change with adriamycin administration. *Cancer Treat Rep* 62: 931-934 (1978)

- 157) Moudal, H., A. Sutton et al.: Highly purified mRNA for myosin heavy chain: Size and polyadenylic acid content. Biochemical and Biophys Research Commun. 56: 988-996 (1974)
- 158) Morgan, H., L. Jefferson et al.: Regulation of protein synthesis in heart muscle. II. Effects of amino acid levels and insulin on ribosomal aggregation. Journal of Biological Chemistry 246: 2163-2170 (1971)
- 159) Munro, H., A. Fleck: The determination of nucleic acids. Interscience, New York, London, Sydney. Methods of biochemical analysis, Vol. 14: 113-176 (1966)
- 160) Myers, C., W. McGuire et al.: Adriamycin: amelioration of toxicity by α -tocopherol. Cancer Treat Rep 60: 961-962 (1976)
- 161) Myers, C., W. McGuire et al.: Adriamycin: The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. Science 197: 165-167 (1977)
- 162) O'Bryan, R.M., J.K. Luce et al.: Phase II evaluation of adriamycin in human neoplasia. Cancer 32: 1-8 (1973)

- 163) Oldham, R.V., T.C. Pomery: Treatment of Ewing's sarcoma with adriamycin (NSC 123127) Cancer Chemother Rep 56: 635-659 (1972)
- 164) Olson, H.M., D.M. Young et al.: Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin treated rabbits. Am J. Pathol. 77: 455-466 (1974)
- 165) Pelham, R., R. Jackson: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur J Biochem 67: 247-256 (1976)
- 166) Philips, F.S., A. Gilladoga et al.: Some observations on the toxicity of adriamycin (NSC-123127). Cancer Chemother Rep Part 3. Vol. 6 No. 2: 177-181 (1975)
- 167) Pigram, W.J., W. Fuller et al.: Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. Nature (New Biol) 235: 17-19 (1972)
- 168) Posner, B., L. Mierzwinski et al.: Studies on amino acid levels and transport in the mechanically stressed rat heart. J Mol Cell Cardiol 5: 221-233 (1973)
- 169) Praga, C., G. Beretta et al.: Kardiotoxizität von Doxorubicin (Adriamycin): Retrospektive Studie über 1273 Patienten. Adriamycin, 3. Bd., Fetzner, J., Füllenbach, D., Musil, J., eds., Solide Tumoren, Hämoblastosen: 145 (1980)

- 170) Proceedings of the conference on non invasive and invasive prospective monitoring for anthracyclin cardiotoxicity (Sept 19, 1977, Bethesda, Maryland). Ed. by Myers, C.E. and McGuire, W.P. Cancer Treat Rep 62 (6): 855-979. (1978)
- 171) Prout, M.N., M.J.S. Richards et al.: Adriamycin cardiotoxicity in children. Case reports, literature review, and risk factors, Cancer 39: 62-65 (1977)
- 172) Ramos, A., R.A. Meyer et al.: Echocardiographic evaluation of adriamycin cardiotoxicity in children. Cancer Treat Rep 60: 1281-1284 (1976)
- 173) Reichenbach, D.D., E.P. Benditt: Myofibrillar degeneration: a response of myocardial injury. Arch Pathol 85: 189-199 (1968)
- 174) Rinehart, J.J., R.P. Lewis et al.: Adriamycin cardiotoxicity in man. Ann Int Med 81: 475-478 (1974)
- 175) Roberts, B., B. Paterson: Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. PNAS USA 70: 2330-2334 (1973)

- 176) Rosen, G., N. Wollner et al.: Disease free survival in children with Ewing's sarcoma treated with radiation therapy and adjuvant four drug sequential chemotherapy. *Cancer* 33: 384-393 (1974)

- 177) Rosenoff, S.H., E. Brooks et al.: Alterations of DNA synthesis in heart, bone marrow and G.I. mucosa induced by adriamycin in vivo: relationship to fatal toxicity. *Proc. of AACR and ASCO* 15: 38, (1974)

- 178) Rosenoff, S.H., E. Brooks et al.: Alterations in DNA synthesis in cardiac tissue induced by adriamycin in vivo - Relationship to fatal toxicity. *Biochem Pharmacol*, 24: 1898-1901 (1971)

- 179) Rosenoff, S.H., H.M. Olson et al.: Adriamycin-induced cardiac damage in the mouse: a small animal model of cardiotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 55: 191 (1975)

- 180) Sala-Trepat, J., Savage M. et al.: Isolation and characterization of poly-(adenylic acid)-containing messenger ribonucleic acid from rat liver polysomes. *Biochimica et biophysica acta* 519: 173-193 (1978)

- 181) Sarkar, S., S.-Mukherjee et al.: Isolation of messenger ribonucleic acid for myosin heavy chain. *Preparative Biochemistry* 3: 583-604 (1973)

- 182) Schein, P.: Recent Results in Cancer Research 63, in: Antitumor Antibiotics, Carter, S.K., Umezawa, H. Douros, J., Sakurai, Y., eds., Springer-Verlag (1978)
- 183) Selawry, O.S., H.H. Hansen: Lung cancer. In: Cancer Medicine, edited by Holland, J.F., Frei, E., Philadelphia, Lea and Fibiger: 1473-1518 (1973)
- 184) Seraydarian, M., L. Artaza et al: Adriamycin: effect on mammalian cardiac cells in culture I. Cell population and energy metabolism. I Mod Cell Cardial 9: 375-382 (1977)
- 185) Singer, J-W., K.A. Narahara et al.: Time- and dose-dependent changes in ejection fraction determined by radionuclide angiography after anthracycline therapy. Cancer Treat Rep 62: 945 (1978)
- 186) Skarin, A., D. Rosenthal et al.: Treatment of advanced non-Hodgkin's lymphomas with bleomycin, adriamycin, cyclophosphamide, vincristine and prednisone (BACOP). Proc. AACR and ASCO 15: 133 (1974)
- 187) Smith, P.J., H. Ekert et al.: High incidence of cardiomyopathy in children treated with adriamycin and DTIC in combination chemotherapy. Cancer Treat Rep 61: 1736-1739 (1977)

- 188) Sutow, W.W., M.P. Sullivan et al.: Adjuvant chemotherapy in primary treatment of osteogenic sarcoma. Proc. of AACR and ASCO 15: 20 (1974)
- 189) Tan, C., H. Tasaka et al.: Daunomycin an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic disease. Cancer 20: 333 (1967)
- 190) Tan, C., E. Etcubanas et al.: Adriamycin, an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic disease. Cancer 32: 9-17 (1973)
- 191) Taylor, J.: The isolation of eukaryotic messenger RNA. Ann Rev Biochem 48: 681-717 (1979)
- 192) Thigpen, T., J. Torres et al.: Phase II trial of adriamycin in the treatment of advanced endometrial carcinoma. Proc. of AACR and ASCO 18: 352 (1977)
- 193) Trouet, A., D.D. Campeneere et al.: Chemotherapy through lysosomes with a DNA-daunorubicine complex. Nature (New Biol) 239: 110-112 (1972)
- 194) Underwood, E.J.: Trace Elements in Human and Animal Nutrition. New York: Academic Press. (1971)

- 195) Vig, B.K.: Chromosome aberrations in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. *Cancer Res* 31: 32-38 (1971)
- 196) Von Hoff, D.D., M.W. Layard et al.: Risikofaktoren für Adriamycininduzierte Herzinsuffizienz. *Adriamycin*, 3. Band, Solide Tumoren, Hämoblastosen, Fetzner, J., Füllenbach, D., Musil, J., eds.: 39 (1980)
- 197) Von Hoff, D.D., Rosencweig N. et al.: Daunomycin-induced cardiotoxicity in children and adults. *Am J Med* 62: 200-208 (1977)
- 198) Wampler, G.L., V.J. Speckhart et al.: Phase I trial of Adriamycin - ICRF 159 combination. In: Staquet, M., Tagnon, H., Kenis, Y., et al. eds.: *Adriamycin Review*, Ghent: European Press Medikon: 279-289 (1975)
- 199) Wang, J., E.P. Cortes et al.: Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patient with neoplastic diseases. *Cancer* 28: 837-843 (1971)
- 200) Weiss, A.J., G.E. Metter et al.: Studies on Adriamycin using a Weekly Regimen Demonstrating its Clinical Effectiveness and Lack of Cardiac Toxicity. *Cancer Treat Rep* 60: 813-822 (1976)

- 201) Weiss, A.J., G.F. Metter et al.: The cardiac toxicity of adriamycin. Proc. AACR, Toronto, Abstract. (1976)

- 202) Wiernick, P.H., A. Serpick: A randomized clinical trial of daunomycin and a combination of prednisone, vincristine, 6-mercaptopurine, and methotrexate in adult acute non-lymphocytic leukemia. Cancer Res 32: 2023-2026 (1972)

- 203) Wilbur, J., E. Etcubanas et al.: 4-drug therapy and irradiation in primary and metastatic osteogenic sarcoma. Proc. AACR and ASCO 15: 188 (1974)

- 204) Witham, A.C.: Cardiomyopathy (myocardosis) Idiopathic concentric hypertrophy and restrictive cardiomyopathy. In: The Heart, Arteries and Veins, ed. by Hurst, J.W., Loque, R.B., New York, McGraw-Hill Book Co., Inc.: 1212-1217 (1970)

- 205) Yagoda, A., R.C. Watson et al.: Adriamycin and cyclophosphamide in advanced bladder cancer. Cancer Treat Rep 61: 97-99 (1977)

- 206) Young, D.M.: Pathologic effects of adriamycin (NSC-123127) in experimental systems. Cancer Chemother Rep Part 3, Vol. 6, No. 2: 159-175 (1975)

- 207) Zähringer, J, B. Baliga, R. Drake, H. Munro:
Distribution of ferritin-mRNA and albumin-mRNA
between free and membrane bound rat liver poly-
somes. Biochim Biophys Acta 474: 234-244 (1977)
- 208) Zähringer, J.: Die Regulation der Herzmuskel-
proteinsynthese. Klin. Wschr. 57, 541-553 (1979)
- 209) Zähringer, J., B. Höfling: Adriamycin-Cardio-
myopathy: Changes in myocardial polyribosome
and mRNA levels. In: Myocardial Biopsy (Ed.
Bolte, H.D.), Springer-Verlag, Berlin, Heidel-
berg, New York: 119-130 (1980)
- 210) Zähringer, J., B. Höfling, W. Raum, R. Kandolf:
Effect of adriamycin on the polyribosome and
messenger-RNA content of rat heart muscle. Bio-
chim Biophys Acta 608: 315-323 (1980)
- 211) Zähringer, J., R. Kandolf, W. Raum: Decrease
of myocardial messenger-RNA in adriamycin-
treated rats. FEBS Letters : (1981)
- 212) Zähringer, J., W. Raum, R. Kandolf, G. Troesch,
G. Stäb, E. Jäger: Isolation and characteriza-
tion of structurally and functionally intact
polyribosomes and mRNA from rat heart muscle.
J Mol Cell Cardiol: 127-146 (1981)
- 213) Zähringer, J.: The Regulation of Protein Synthe-
sis in Heart Muscle under Normal Conditions and
in the Adriamycin-Cardiomyopathy. Klin Wochen-
schrift 59: 1273-1287 (1981)

- 214) Zbinden, G., E. Bachmann et al.: Study of Coenzyme Q in toxicity of adriamycin in Biochemical and Clinical Aspects of Coenzyme Q. Folkers, K., Yamamura, Y., (eds.), Amsterdam: Elsevier Scientific (1977)
- 215) Zedeck, M.S., F. Formelli et al.: Effect of adriamycin in mouse heart. Abstr. 65, AACR 67th Meet., Toronto, Canada, May 4-8 (1976)

Danksagungen

Mein tiefer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern. Sie haben mir eine besondere Schulausbildung und ein langes Studium in echter Großzügigkeit ermöglicht. Ihnen verdanke ich, den anspruchsvollen Beruf des Arztes ergreifen zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Josef Zähringer danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, das Bereitstellen eines beispielhaft ausgestatteten Arbeitsplatzes, sein Vertrauen und seine Unterstützung.

Meinem Kollegen, Herrn Dr. med. R. Kandolf und den Assistentinnen des Labors, Frä. G. Troesch, Frä. P. Forster, Frä. E. Jäger, insbesondere aber Frä. G. Stäb bin ich für die intensive, verantwortungsbewußte, selbständige und präzise Mitarbeit, die das Maß des Üblichen weit übersteigt, großen Dank schuldig.

Lebenslauf

Ich, Walter Johannes Michael Raum, wurde am 27. Dezember 1954 in München als Sohn des Bankkaufmanns Walter Raum und seiner Ehefrau Erna, geb. Gröschel, geboren.

Nach der Volksschule in München und Etterzhausen bei Regensburg besuchte ich von 1965 an das humanistische Musikgymnasium der Regensburger Domspatzen zu Regensburg. Dort legte ich auch 1974 das Abitur erfolgreich ab.

Für das Frühjahr 1975 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Medizin und immatrikulierte mich zum Sommer-Semester 1975 an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München an der Medizinischen Fakultät.

Im April 1981 beendete ich erfolgreich mein Studium mit dem 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Im Mai 1981 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

